

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

‘ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ’

ΠΟΙΟΤΗΤΑ-ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Προσδιορισμός Υπολειμμάτων
Φυτοπροστατευτικών Ουσιών στα Εδώδιμα
Έλαια**

ΚΕΡΑΣΙΑ ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΠΑΠΟΥΤΣΙΔΑΚΗ

Γεωπόνος Φυτικής παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2011

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Ιατρικής

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

‘Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία & Περιβαλλοντική Υγιεινή’

Ποιότητα-Ασφάλεια Τροφίμων και Υδάτων & Δημόσια Υγεία

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**‘Προσδιορισμός Υπολειμμάτων Φυτοπροστατευτικών Ουσιών στα
Εδώδιμα Έλαια’**

Κερασία Γεωργίου Παπουτσιδάκη

Γεωπόνος φυτικής παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, 2011

Τριμελής Επιτροπή:

Τσιρόπουλος Νικόλαος: Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής
Παραγωγής και Αγροτικού περιβάλλοντος
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τσακάλωφ Ανδρέας: Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αμβράζη Ελπινίκη: Επιστημονικός Συνεργάτης, Τμήμα Γεωπονίας
Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού
Περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Λέξεις Κλειδιά: υπολείμματα, φυτοπροστατευτικές ουσίες, γεωργικά φάρμακα, ελαιόλαδο, εδάφιμα έλαια, ανάλυση υπολειμμάτων, αέρια χρωματογραφία, ADI, MRL.

Η παρούσα μελέτη, στο πλαίσιο της υλοποίησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής, εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σκοπός: Η επικύρωση και η εφαρμογή σύγχρονων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών (φ.ο.) στο ελαιόλαδο και σε άλλα εδάφιμα έλαια, όπως καλαμποκέλαιο και ηλιέλαιο. Η παρακολούθηση της συμπεριφοράς κάποιων φ.ο. κατά την ελαιοποίηση του ελαιοκάρπου με την εκτίμηση του συντελεστή επεξεργασίας από τον ελαιοκάρπο στο ελαιόλαδο. Οι φ.ο. στόχοι της μελέτης ανήκουν στις ομάδες των οργανοχλωριωμένων (α -Endosulfan, β -Endosulfan, Endosulfan sulfate) και πυρεθροειδών (Bifenthrin, Lambda cyhalothrin, cypermethrin και Deltamethrin) εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται ή χρησιμοποιήθηκαν τα τελευταία χρόνια στη φυτοπροστασία των καλλιεργειών.

Μεθοδολογία: Η αναλυτική μεθοδολογία βασίστηκε σε δοκιμές της μεθόδου της QuEChERS ως τεχνικής εκχύλισης, ενώ για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των φ.ο. στόχων χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD). Για την αξιολόγηση της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης με εμβολιασμούς όλων των υποστρωμάτων της μελέτης στα επίπεδα 0,05, 0,10 και 0,50 mg/kg και εκτιμήθηκαν η ορθότητα, η ακρίβεια, η γραμμικότητα, η ευαισθησία και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου. Για την ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του εξωτερικού προτύπου με τη χρήση μικτών πρότυπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα του κάθε υποστρώματος. Για την εκτίμηση του συντελεστή επεξεργασίας πραγματοποιήθηκαν πειράματα εργαστηριακής μικρο-ελαιοποίησης ψεκάσμενου ελαιοκάρπου και προσδιορίστηκαν τα υπολείμματα της φ.ο. στην ελαιόμαζα και στο παραγόμενο ελαιόλαδο.

Αποτελέσματα & Συζήτηση: Η αναλυτική μέθοδος εμφάνισε σχετικά χαμηλές έως ικανοποιητικές τιμές ανακτήσεων που κυμάνθηκαν από 45 ± 8 έως 82 ± 3 για το καλαμποκέλαιο, 45 ± 5 έως 87 ± 5 για το ηλιέλαιο και 43 ± 16 έως 68 ± 8 για το ελαιόλαδο καθώς και ικανοποιητικές τιμές επαναληψιμότητας. Τις υψηλότερες ανακτήσεις εμφάνισαν οι ουσίες Endosulfan sulfate, Lambda cyhalothrin και Cypermethrin. Θετική επίδραση υποστρώματος εμφάνισαν όλες οι φ.ο. στόχοι στο υπόστρωμα καλαμποκέλαιο. Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ήταν και για τα τρία έλαια 0,05 mg/kg, ενώ το MQL κυμάνθηκε από $<0,001$ mg/kg για τα Endosulfan έως 0,01 mg/kg. Ο συντελεστής επεξεργασίας για το Cypermethrin βρέθηκε ίσος με 2,5-2,75.

Συμπεράσματα: Αν και σχετικά χαμηλών ανακτήσεων η αναλυτική μεθοδολογία λόγω των ικανοποιητικών τιμών επαναληψιμότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φ.ο. στο ελαιόλαδο και στα άλλα εδάφιμα έλαια. Η τιμή του συντελεστή επεξεργασίας για το Cypermethrin δηλώνει την συμύκνωση των υπολειμμάτων του κατά τη διαδικασία της ελαιοποίησης, συμπεριφορά που έχει παρατηρηθεί και για άλλα πυρεθροειδή μόρια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	ii
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	iii
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	v
ΜΕΡΟΣ Ι.....	
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΕΔΩΔΙΜΑ ΕΛΑΙΑ.....	1
1.1. Ηλιέλαιο- Ηλίανθος.....	1
1.1.1. Ιστορική αναδρομή.....	2
1.1.2. Συστηματική κατάταξη- Βοτανικά χαρακτηριστικά ηλίανθου	2
1.1.3. Η σημασία του ηλιελαίου.....	3
1.1.4. Τάσεις στη παραγωγή του ηλιελαίου.....	4
1.2. Ελαιόλαδο- Ελιά.....	8
1.2.1. Ιστορική αναδρομή.....	8
1.2.2. Συστηματική κατάταξη- Βοτανικά χαρακτηριστικά της ελιάς	9
1.2.3. Τρόπος παραγωγής του ελαιολάδου.....	12
1.2.4. Ποιότητα ελαιολάδου- Κατηγορίες.....	14
1.2.5. Πως εξασφαλίζουμε καλό ελαιόλαδο.....	15
1.2.6. Χημική σύσταση ελαιολάδου.....	16
1.2.7. Διατροφική αξία ελαιολάδου.....	17
1.2.8. Επικίνδυνες προσμίξεις στο ελαιόλαδο.....	18
1.3. Καλαμποκέλαιο- Καλαμπόκι.....	19
1.3.1. Ιστορική αναδρομή.....	19
1.3.2. Συστηματική κατάταξη- Βοτανικά χαρακτηριστικά	19
1.3.3. Χρήσεις καλαμποκιού.....	20
1.3.4. Διατροφική αξία καλαμποκέλαιου.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2–ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΚΑΙ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	22
2.1. Ιστορική αναδρομή.....	22
2.2. Ορισμός υπολειμμάτων στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα	23
2.3. Σημαντικότερες συνέπειες των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στο ελαιόλαδο- ελαιόκαρπο.....	25
2.4. Κατηγορίες φυτοπροστατευτικών ουσιών.....	26

2.5. Φυτοπροστατευτικές ουσίες που εμφανίζονται στα εδάδιμα έλαια.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 -ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ Φ.Ο.	31
3.1. Στάδια προσδιορισμού υπολειμμάτων.....	31
3.1.1. Δειγματοληψία.....	31
3.1.2. Επεξεργασία και αποθήκευση.....	32
3.1.3. Επιλογή αναλυτικής μεθόδου.....	32
3.1.4. Αναλυτική μεθοδολογία.....	33
3.2. Φάσεις προσδιορισμού υπολειμμάτων.....	34
3.2.1. Προετοιμασία των δειγμάτων.....	34
3.2.2. Εκχύλιση.....	34
3.2.3. Διήθηση.....	35
3.2.4. Καθαρισμός εκχυλίσματος.....	35
3.2.5. Συμπύκνωση του εκχυλίσματος.....	36
3.3. Τεχνικές εκχύλισης.....	36
3.3.1. Εκχύλιση υγρού-υγρού.....	36
3.3.2. Εκχύλιση στερεού-υγρού.....	36
3.3.3. Εκχύλιση με μικροκύματα.....	37
3.3.4. Επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη.....	37
3.3.5. Εκχύλιση υπερκρίσιμου σημείου.....	38
3.3.6. Εκχύλιση στερεάς φάσης.....	38
3.3.7. Χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής ή μοριακού διαχωρισμού.....	39
3.4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός.....	40
3.5. Ενόργανες τεχνικές προσδιορισμού υπολειμμάτων.....	40
3.5.1. Αέρια χρωματογραφία.....	40
3.5.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	41
3.6. Εκτίμηση των αποτελεσμάτων και αξιολόγηση μεθόδων προσδιορισμού	43
3.7. Η σημαντικότητα της εκχύλισης και η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου.....	43
3.8. Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων ανά ομάδα δραστικών ουσιών	45
3.9. QuEChERS- Μία νέα μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων	48
3.9.1. Ιστορική αναδρομή.....	48
3.9.2. Εφαρμογή της QuEChERSστην ανάλυση καρπών ελιάς και ελαιολάδου.....	49
3.10. Επικύρωση των μεθόδων προσδιορισμού.....	52
ΜΕΡΟΣ II.....	
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	59
1.1. Αντιδραστήρια και διαλύτες.....	60
1.2. Δραστικές ουσίες και πρότυπα διαλύματα.....	60
1.3. Υλικά και Όργανα- Εξοπλισμός.....	61
1.4. Εκχύλιση υπολειμμάτων από εδώδιμα έλαια.....	62
1.5. Έλεγχος αναλυτικής διαδικασίας- Πειράματα ανάκτησης σε εδώδιμα έλαια	63
1.6. Πείραμα εκτίμησης του συντελεστή συμπύκνωσης του Cypermethrin από την ελιά στο λάδι.....	65
1.6.1. Εκχύλιση δειγμάτων ελιάς για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων Cypermethrin	67
1.6.2. Εκχύλιση ελαιολάδου για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων Cypermethrin	68
1.7. Δείγματα εδωδιμων ελαίων που αναλύθηκαν.....	69
1.8. Προσδιορισμός των Φ.Ο. με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας.....	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	72
2.1. Διαχωρισμός των δραστικών ουσιών.....	72
2.2. Ποσοτική ανάλυση-Καμπύλες βαθμονόμησης	79
2.3. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου- Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης	90
2.3.1. Πειράματα ανάκτησης με τη μέθοδο της QuEChERS σε καλαμποκέλαιο, ηλιέλαιο και ελαιόλαδο.....	90
2.3.2. Πειράματα ανάκτησης με την ίδια μέθοδο εκχύλισης για τον προσδιορισμό σε ελιά.....	94
2.4. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου – Όρια ποσοτικοποίησης.....	94
2.5. Εφαρμογή της μεθόδου στην ανάλυση δειγμάτων εδωδιμων ελαίων εμπορίου.....	97
2.6. Προσδιορισμός συντελεστή συμπύκνωσης του Cypermethrin από τον ελαιόκαρπο στο ελαιόλαδο κατά τις διάφορες διεργασίες παραλαβής ελαιολάδου	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	105
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	109
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	109
ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	110

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Νικόλαο Τσιρόπουλο για την υποδοχή στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και για την καθοδήγηση, τις συμβουλές του και την επιστημονική στήριξη κατά τη διάρκεια όλης αυτής της προσπάθειας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ανδρέα Τσακάλωφ στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας με τις πολύτιμες διορθώσεις του και την ερευνήτρια του Περιφερειακού Κέντρου Φυτοπροστασίας Βόλου και επιστημονική συνεργάτιδα του Εργαστηρίου Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας Δρ. Ελπινίκη Αμβράζη για τη πολύτιμη βοήθεια της κατά το ξεκίνημα αυτής της μελέτης αλλά και για τις διορθώσεις- επισημάνσεις της στη συγγραφή αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ασημίνα Ψύλλου-Παπαδή, για την καθοδήγηση, την άριστη συνεργασία μας και την ουσιαστική βοήθεια για την εκπόνηση της διπλωματικής μου διατριβής.

Δε μπορώ βέβαια να παραλείψω τις ευχαριστίες μου προς όλα εκείνα τα άτομα που συμμετείχαν και με υποστήριξαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη βοήθεια και την υποστήριξη που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία α-Endosulfan σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου.....	85
Διάγραμμα 2: Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία β-Endosulfan σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου.....	86
Διάγραμμα 3: Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Endosulfan sulfate σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου.....	86
Διάγραμμα 4: Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Bifenthrin σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου.....	87
Διάγραμμα 5: Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Lambda cyhalothrin σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου.....	87
Διάγραμμα 6: Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Cypermethrin σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου.....	88
Διάγραμμα 7: Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Deltamethrin σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου.....	88
Διάγραμμα 8: Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Cypermethrin σε εκχύλισμα υποστρώματος ηλιελαίου.....	89
Διάγραμμα 9: Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Deltamethrin σε εκχύλισμα υποστρώματος ηλιελαίου.....	89

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά	viii
Πίνακας 2: Δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά	ix
Πίνακας 3: Μέση σύνθεση των οξέων του ηλιελαίου	7
Πίνακας 4: Φυσικές και χημικές σταθερές του ηλιελαίου	7
Πίνακας 5: Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα	17
Πίνακας 6: Κατάλογος δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στη καλλιέργεια της ελιάς, καλαμποκιού και ηλίανθου	30
Πίνακας 7: Χρόνοι κατακράτησης και τυπική απόκλιση για τις επτά δραστικές ουσίες της μελέτης	73
Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά καμπύλων αναφοράς για τις δραστικές ουσίες και εκτίμηση επίδρασης υποστρώματος ηλιελαίου και ελαιολάδου.....	80
Πίνακας 9: Χαρακτηριστικά καμπύλων αναφοράς για τις δραστικές ουσίες και εκτίμηση επίδρασης υποστρώματος καλαμποκέλαιου.....	81
Πίνακας 10: Αποτελέσματα σύγκρισης χρωματογραφικών αποκρίσεων	84
Πίνακας 11. Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης σε διαφορετικά επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα καλαμποκέλαιου και ηλιελαίου και υπολογισμός του μέσου όρου ανακτήσεων και τυπικής απόκλισης	92
Πίνακας 12. Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης σε διαφορετικά επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα ελαιολάδου και υπολογισμός του μέσου όρου ανακτήσεων και τυπικής απόκλισης	93

Πίνακας 13: Όρια ποσοτικοποίησης LOQ, MQL(mg/kg) για τις δραστικές ουσίες της αναλυτικής μεθόδου για τα εδώδιμα έλαια και τα ανώτατα επιτρεπτά όρια για τις δραστικές ουσίες σε ελιά, καλαμπόκι και ηλίανθο	96
Πίνακας 14: Αποτελέσματα της ανάλυσης δειγμάτων διαφόρων εδωδιμων ελαίων για προσδιορισμό υπολειμμάτων φ.ο. στόχων της μελέτης	98
Πίνακας 15: Προσδιορισμός συντελεστή συμπύκνωσης της δραστικής ουσίας Cypermethrin από την ελιά στο ελαιόλαδο.....	103

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Από τα στοιχεία που παρουσιάστηκαν στο εισαγωγικό μέρος της διατριβής καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι ελαιοπαραγωγοί χρησιμοποιούν σήμερα ένα σχετικά περιορισμένο εύρος φυτοπροστατευτικών ουσιών σε σχέση με το παρελθόν (πριν το 2008) προκειμένου να μειώσουν την οικονομική ζημιά που υφίστανται στα ελαιόδεντρα τους λόγω της προσβολής του δάκου. Έτσι οι φυτοπροστατευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση και καταπολέμηση του δάκου ανήκουν σχεδόν αποκλειστικά στην ομάδα των πυρεθρινοειδών, ενώ πριν από το 2008 χρησιμοποιούνταν κυρίως οργανοφωσφορικά και Οργανοχλωριωμένα (Endosulfan) εντομοκτόνα. Σχετικά με την παραμονή υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στον ελαιόκαρπο το ενδιαφέρον εστιάζεται κυρίως στις φ.ο. που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του δάκου καθώς οι επεμβάσεις αυτές είναι οι τελευταίες που πραγματοποιούνται χρονικά, πριν αρχίσει να λαδώνει ο καρπός. Αν και οι επεμβάσεις πραγματοποιούνται Ιούνιο με Αύγουστο έχει διαπιστωθεί ότι αρκετές από αυτές τις ουσίες συγκεντρώνονται και στο ελαιόλαδο καθώς αφενός είναι λιπόφιλες χημικές ενώσεις αλλά και η παραγωγή ελαιολάδου είναι μια διαδικασία συμπίκνωσης (1kg ελαιόλαδο προκύπτει από 4-5 kg ελαιόκαρπου). Επομένως, προκειμένου να διασφαλιστεί η ποιότητα-ασφάλεια του προϊόντος και κατ'επέκταση η υγεία των καταναλωτών, κρίνεται απαραίτητος ο έλεγχος για την παρουσία και τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων των φ.ο. στον ελαιόκαρπο και στο ελαιόλαδο αφού, αποτελώντας βασικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής, συμμετέχει σημαντικά στη διατροφή του. Η κοινοτική νομοθεσία δεν προβλέπει θεσμοθετημένα ανώτατα επιτρεπτά όρια (MRLs) υπολειμμάτων φ.ο. στο ελαιόλαδο, αλλά μόνο στην πρώτη ύλη, τον ελαιόκαρπο.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω για το ελαιόλαδο, αλλά και θεωρώντας ότι συνεχώς αυξάνεται το ποσοστό συμμετοχής στη διατροφή και άλλων εδώδιμων ελαίων (είτε άμεσα είτε έμμεσα), όπως το ηλιέλαιο, το αραβοσιτέλαιο κ.α., στην εργασία αυτή, μεταξύ αναλυτικών μεθοδολογιών που δοκιμάστηκαν, εφαρμόστηκε και επικυρώθηκε η αναλυτική μεθοδολογία για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των φ.ο. σε εδώδιμα έλαια. Η ιδιαιτερότητα των υποστρωμάτων αυτών (εδώδιμα έλαια) ως προς την

περιεκτικότητά τους σε λίπη καθιστά τη διαδικασία της εκχύλισης των φ.ο. ιδιαίτερη απαιτητική κυρίως ως προς το στάδιο του καθαρισμού του εκχυλίσματος (clean up) από τις λιπαρές ύλες που δημιουργούν πολλά προβλήματα στην χρωματογραφική ανάλυση. Για το λόγο αυτό για την εκχύλιση των φ.ο. προκρίθηκε η δοκιμή της τεχνικής QuEChERS (Γρήγορα, εύκολα, φθηνά, αποτελεσματικά, τραχύ και ασφαλή - Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust, Safe - QuEChERS), η οποία πέραν της εφαρμογής της στην ανάλυση του ελαιολάδου δοκιμάστηκε και εφαρμόστηκε και στην ανάλυση και των άλλων εδώδιμων ελαίων. Αυτή η μέθοδος για την επεξεργασία του δείγματος (εκχύλιση και καθαρισμός εκχυλίσματος) χρησιμοποιείται από το 2000 σε ποικίλα υποστρώματα, όπως φρούτα και λαχανικά, ενώ με κάποιες διαφορές-τροποποιήσεις ή και βελτιώσεις στην ανάλυση λιπαρών υποστρωμάτων όπως είναι η ελιά και το ελαιόλαδο.

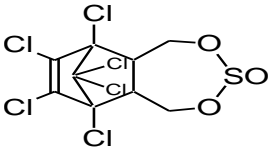
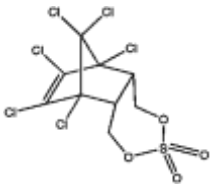
Επίσης, αυτή η αναλυτική μεθοδολογία που δοκιμάστηκε και επικυρώθηκε εφαρμόστηκε σε πραγματικά εμπορικά δείγματα εδώδιμων ελαίων για τον έλεγχο της παρουσίας και τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ουσιών στόχων της μελέτης.

Ως φυτοπροστατευτικές ουσίες – στόχοι της μελέτης επιλέχθηκαν όχι μόνο οι δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη προστασία του ελαιόδεντρου και των άλλων καλλιεργειών, δηλαδή κυρίως οι Πυρεθρίνες, αλλά και το οργανοχλωριωμένο εντομοκτόνο Endosulfan (τα μητρικά ισομερή α- και β- Endosulfan και το μεταβολίτη του Endosulfan sulfate), το οποίο έχει αποσυρθεί. Παρόλο που δεν χρησιμοποιείται σήμερα το Endosulfan, η εμμονή (persistence) του στο περιβάλλον και η διάχυσή του μέσω της ατμοσφαιρικής κυκλοφορίας το κάνει να είναι ένας ρύπος (όπως και όλες οι ουσίες της ομάδας των οργανοχλωριωμένων) μείζονος σημασίας τόσο για το περιβάλλον όσο και για την υγεία των καταναλωτών. Πιο αναλυτικά, οι ουσίες στόχοι της εργασίας αυτής παρουσιάζονται στον **πίνακα 1**, με τα αντίστοιχα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά. Η ανάλυση και ο προσδιορισμός αυτών των ουσιών του πίνακα 1 είναι εφικτός με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας με πολυπολεμιματική μέθοδο χρησιμοποιώντας ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD) ή σε συζευγμένο σύστημα αέριας χρωματογραφίας και φασματογραφίας μάζας (GC-MS).

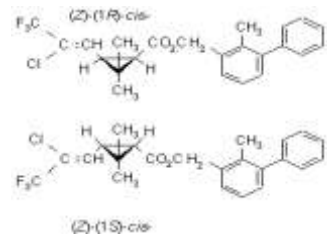
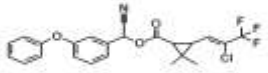
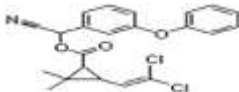
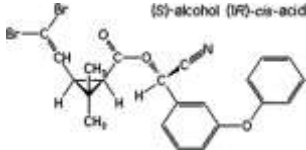
Ένας ακόμη στόχος της εργασίας αυτής ήταν να εκτιμηθεί ο συντελεστής συμπίκνωσης του Cypermethrin (της πιο συχνά ανιχνευόμενης στον ελαιόκαρπο και στο ελαιόλαδο φυτοπροστατευτικής ουσίας) κατά τη διαδικασία της ελαιοποίησης από τον ελαιόκαρπο στο ελαιόλαδο. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν εργαστηριακές ελαιοποιήσεις εμβολιασμένου ελαιόκαρπου και μετρήθηκαν τα υπολείμματα του cypermethrin στον ελαιόκαρπο και στο ελαιόλαδο.

Ο προσδιορισμός αυτών των ουσιών **Πίνακας 1-2** είναι εφικτός με αέρια χρωματογραφία και με τη χρήση πολυυπολειμματικής μεθόδου εκχύλισης και απευθύνεται σε ανάλυση φυτικών υποστρωμάτων με μεγάλη περιεκτικότητα λίπους και λιπαρών προϊόντων, όπως το ελαιόλαδο. Η παρούσα πτυχιακή μελέτη κινήθηκε σε αυτά τα πλαίσια, διερευνώντας σύγχρονες αναλυτικές μεθόδους με προσπάθεια βελτιστοποίησης τους με πειράματα ανακτήσεων. Μέσα από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων καταλήξαμε στη χρήση της μεθόδου QuEChERS με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).

Πίνακας 1. Δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά

<i>Δραστική ουσία</i>	<i>Χημική Δομή</i>	<i>Χημική ομάδα/ Χρήση</i>	<i>Vapour Pressure (mPa)</i>	<i>Solubility in Water (mg/L)</i>	<i>log K_{ow}</i>
α- Endosulfan β- Endosulfan		Οργανοχλωριωμένα / Εντομοκτόνο	0,83 mPa (20°C) for 2:1 mixture of α- and β- isomers	alpha-Endosulfan 0,32, beta-Endosulfan 0,33 (both in mg/l, 22 °C)	logP για α- = 4,74 β- = 4,79 (both at pH 5)
Endosulfan - sulfate		Οργανοχλωριωμένα / Εντομοκτόνο (μεταβολίτης του Endosulfan)		< 1 g/l	

(Βεράνη, 2011)

Πίνακας 2. Δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά					
Bifenthrin		Πυρεθρίνες / Εντομοκτόνο	0,024 mPa (25 °C)	< 1 mg/l	logP >6
Lampda cyhalothrin		Πυρεθρίνες / Εντομοκτόνο	2×10^{-4} mPa (20 °C, est.); 2×10^{-1} mPa (60 °C, interpolated)	0,005 mg/l (20 °C)	logP = 7 (20 oC)
Cypermethrin		Πυρεθρίνες / Εντομοκτόνο	$2,0 \times 10^{-4}$ mPa (20 °C)	0,004 mg/l (pH 7)	logP = 6,6
Deltamethrin		Πυρεθρίνες / Εντομοκτόνο	$1,24 \times 10^{-5}$ mPa (25 °C, gas saturation method)	<0,2 µg/l (25 °C)	logP = 4,6 (25 °C)

(Βεράνη, 2011)

ΜΕΡΟΣ Ι

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-ΕΛΩΔΙΜΑ ΕΛΑΙΑ

Εδώδιμα έλαια νοούνται με την ευρύτερη έννοια της λέξης όλα τα φερόμενα για τη διατροφή του ανθρώπου κατάλληλα γλυκερίδια των διαφόρων λιπαρών οξέων φυτική ή ζωικής προέλευσης, τα οποία μπορούν να περιέχουν μικρές ποσότητες άλλων λιποειδών όπως φωσφατίδια, συστατικά και άλλα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Έλαια θεωρούνται τα προϊόντα των οποίων η σύσταση είναι ελαιώδης στη θερμοκρασία των 20°C.

Τα έλαια αποτελούνται σε ποσοστό 95-99% από τριγλυκερίδια που είναι μικτοί εστέρες γλυκερόλης με ανώτερα λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα έχουν αλυσίδα κυρίως με 14-20 άτομα άνθρακα και μπορεί να είναι κορεσμένα ή ακόρεστα. Άλλα συστατικά είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία συνιστούν τη φυσική οξύτητα του ελαίου, σε ποσοστό συνήθως 0,5-5% (που σε ορισμένες περιπτώσεις φτάνει μέχρι και 8% ή και περισσότερο. Σε μικρότερη αναλογία του 1% περιέχονται διάφορες φαινολικές ενώσεις και βιταμίνη Ε, που δρουν ως αντιοξειδωτικά, φωσφατίδια, φυτοστερόλες και ποικίλα ποσά βιταμίνης Α και D (Ανδρικόπουλος, 1999). Το λάδι ή έλαιο είναι υγρό στις συνήθεις θερμοκρασίες περιβάλλοντος, το οποίο παράγεται είτε από ορυκτούς υδρογονάνθρακες είτε από φυτά ή από τη συμπίεση σπόρων φυτών και κύριο χαρακτηριστικό του είναι ότι δεν αναμιγνύεται με το νερό (wikipedia, oils).

1.1. Ηλιέλαιο- Ηλίανθος

Το ηλιέλαιο ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των σπορελαίων, των ελαίων δηλαδή που λαμβάνονται με έκθλιψη ή με εκχύλιση των ελαιούχων καρπών και σπερμάτων και διαφόρων φυτών και διατίθενται στην κατανάλωση μετά από κατάλληλη επεξεργασία εξευγενισμού. Πιο συγκεκριμένα το ηλιέλαιο είναι το έλαιο που λαμβάνεται (30-40%) με ψυχή πίεση από τα σπέρματα του ηλίανθου (*Helianthus annuum*). Ως αποτέλεσμα προκύπτει διαυγές προϊόν, με ξανθωπό χρώμα και ελαφρά γλυκιά γεύση, πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά και ελεύθερο από τοξικές ουσίες. Το ηλιέλαιο είναι υγρό σε θερμοκρασία δωματίου και το ραφινρισμένο είναι διαυγές και έχει κεχριμπαρένιο χρώμα με ελαφριά οσμή ελαίου (wikipedia, sunfloweroil).

1.1.1. Ιστορική αναδρομή

Ο ηλίανθος είναι ιθαγενές φυτό της Βόρειας Αμερικής και αυτοφύεται στις Η.Π.Α., στο Καναδά και το Μεξικό. Ο μονοστέλεχος τύπος ηλίανθου με σπόρο παρόμοιο με το σημερινό καλλιεργήθηκε από τους Ινδιάνους της Βόρειας Αμερικής το 3000 π.χ.

Οι πρώτες απόπειρες βελτίωσης του ηλίανθου ξεκίνησαν με την εξάπλωση της καλλιέργειας του ηλίανθου ως ελαιοδοτικό φυτό. Εξαιτίας των ερμαφρόδιτων ανθέων, η επίτευξη της ετέρωσης στα υβρίδια ηλίανθου έγινε εφικτή με την ταυτοποίηση κατάλληλων πηγών αρρενοστεριότητας. Τα υβρίδια ηλίανθου συνέβαλλαν, χωρίς αμφιβολία, στην αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής ηλίανθου. Ως ελαιοδοτικό φυτό καλλιεργείται σε μεγάλη κλίμακα σε πολλές εύκρατες χώρες όπως Χιλή, Ουρουγουάη, Αργεντινή, Τουρκία, Ινδία, Αίγυπτο, Αγγλία, ΗΠΑ και κυρίως στη Ρωσία όπου με βελτίωση ποικιλιών η απόδοση σε έλαιο φτάνει το 50% (wikipedia, sunfloweroil)

1.1.2. Συστηματική Κατάταξη – Βοτανικά Χαρακτηριστικά Ηλίανθου

Ο ηλίανθος ανήκει στην οικογένεια compositae, τάξη (Synantherales). Τα είδη *H. annuus* και *H. tuberosus* χρησιμοποιούνται ως είδη διατροφής, ενώ τα είδη *H. Argophyllus*, *H. debilis*, *H. decapetalus*, *H. maximiliani* και *H. salisifolius* καλλιεργούνται ως καλλωπιστικά. Ο βασικός αριθμός χρωματοσωμάτων είναι 17 και υπάρχουν διπλοειδή, τετραπλοειδή και εξαπλοειδή (Ξανθόπουλος 1993). Οι ποικιλίες διακρίνονται αναλόγως του ύψους σε υψηλόσωμες, μετριόσωμες και χαμηλόσωμες.

Ο καλλιεργούμενος ηλίανθος είναι ένα ασυνήθιστο φυτό, μονοστέλεχο με εντυπωσιακή ταξιανθία, γνωστό από το χαρακτηριστικό του γνώρισμα του ηλιοτροπισμού, που του έδωσε το όνομα *Helianthus*, δηλαδή άνθος του ήλιου.

Ο ηλίανθος αναπτύσσει ένα βαθύ ριζικό σύστημα, πασσαλώδες το οποίο ξεπερνάει τα 2m (Sandras et al., 1989).

Οι ταξιανθίες ακολουθούν τη πορεία του ήλιου κατά τη διάρκεια της ημέρας, μέχρι να αρχίσει η άνθιση. Το φαινόμενο αυτό καλείται ηλιοτροπισμός. Αυτές οι ταξιανθίες τις πρωινές ώρες είναι στραμμένες ανατολικά και στη συνέχεια ακολουθούν τον ήλιο μέχρι τη δύση του. Τη νύχτα επιστρέφουν στην αρχική τους θέση που είχαν το πρωί.

Ο καρπός είναι αχάινιο και έχει μαύρο χρώμα, σταχτί ή γκρι, κηλιδωτό μέχρι άσπρο. Το σχήμα του είναι επίμηκες και μοιάζει με ρόμβο. Το μέγεθος του σπόρου κυμαίνεται σε μεγάλα όρια και οι σπόροι αποτελούν το μισό βάρος του ξηρού δίσκου. Το βάρος 1000 σπόρων κυμαίνεται από 40-100g. Οι σπόροι των ποικιλιών για λάδι είναι πιο μικροί, στρογγυλοί και συμπαγείς. Η αποφλοιώση των σπόρων γίνεται με το πέρασμα των σπόρων ανάμεσα σε δίσκους που περιστρέφονται κατά την αντίθετη φορά. Στη συνέχεια ακολουθεί ο διαχωρισμός με κοσκίνισμα. Η κατεργασία των σπόρων γίνεται με πίεση σε πιεστήρια, όπου η απόδοση των αποφλοιωμένων σπόρων φτάνει το 38% w/w και με εκχύλιση, όπου η απόδοση των σπόρων φτάνει το 44-45% w/w (Μπαλατσούρας, 1995).

1.1.3. Η σημασία του Ηλιελαίου

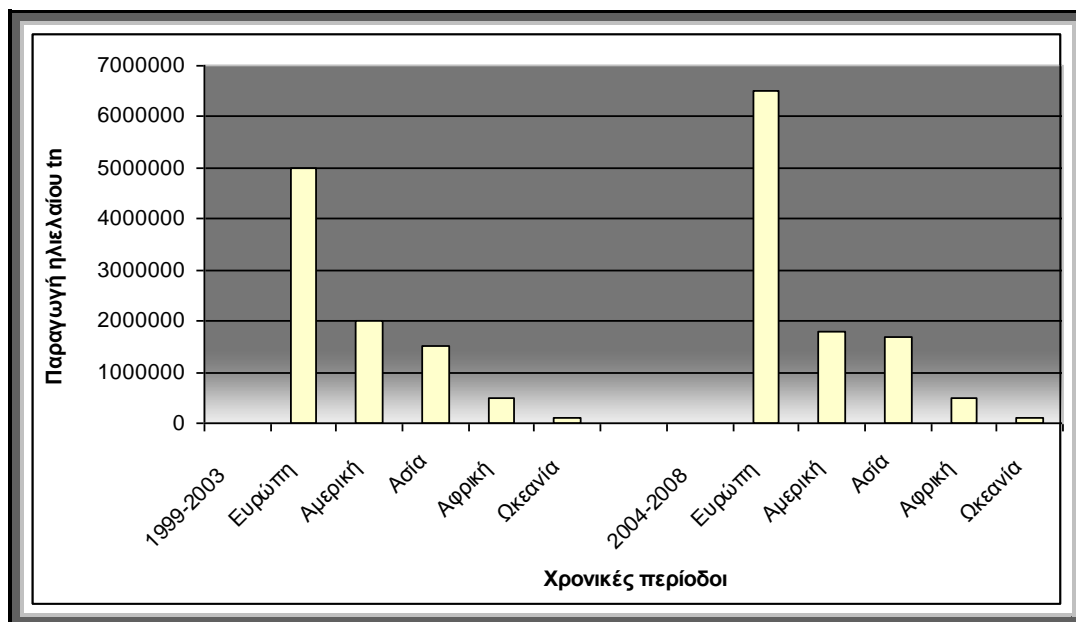
Ο ηλίανθος είναι μία από τις πιο σημαντικές ελαιοδοτικές καλλιέργειες στο κόσμο. Εξαιτίας της μεγάλης προσαρμοστικότητας του φυτού, των χαμηλών καλλιεργητικών απαιτήσεων, της υψηλής ποιότητας του ελαίου του, της περιεχόμενης πρωτεΐνης και της αξιοποίησης όλων των μερών του φυτού η καλλιέργεια του έχει αυξηθεί στις αναπτυγμένες και τις υπανάπτυκτες χώρες. Σήμερα το έλαιο του ηλίανθου κατατάσσεται τέταρτο στη λίστα των παραγόμενων ελαίων σε όλο το κόσμο.

Είναι γνωστή η σημασία της καλλιέργειας του ηλίανθου για τη διατροφή των ανθρώπων και των ζώων. Το έλαιο του ηλίανθου έχει μεγάλο ενεργειακό περιεχόμενο και είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Καταναλώνεται απευθείας και χρησιμοποιείται για τη παρασκευή μαργαρίνης. Προτιμάται πολύ ως έλαιο τηγανίσματος επειδή είναι σταθερό και διατηρεί πολλές από τις ιδιότητες του μετά το τηγάνισμα. Η επιλογή ενός ελαίου για κατανάλωση εξαρτάται από διάφορα κριτήρια: τη σταθερότητα στην οξείδωση, τη γεύση, την υφή, την αίσθηση στο στόμα, τη διαθεσιμότητα, το κόστος, τις διατροφικές και διαιτητικές ανάγκες. Τα πιο σημαντικά κριτήρια είναι η οξειδωτική σταθερότητα και η γεύση του προϊόντος. Σε αντίθεση με άλλα έλαια, το ηλιέλαιο έχει πολύ μικρό ποσοστό λινολενικού οξέος που είναι ευαίσθητο στην οξείδωση. Άλλοι τύποι εδωδιμων ελαίων όπως το σογιέλαιο και το κραμβέλαιο, όταν χρησιμοποιούνται για τηγάνισμα απαιτούν υδρογόνωση προκειμένου να εξαλειφθεί το λινολενικό οξύ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία trans λιπαρών οξέων, τα οποία

ενοχοποιούνται για καρδιαγγειακές ασθένειες. Ενώ η χαμηλή συγκέντρωση κορεσμένων και trans λιπαρών οξέων αποτελεί όφελος για τους καταναλωτές με ιδιαίτερες διαιτητικές απαιτήσεις ή καρδιαγγειακές ασθένειες. Ο ηλίανθος δίνει δύο τύπους σπόρων, τους μεγάλους που προορίζονται για άμεση edώδιμη κατανάλωση και τους μικρούς που είναι κατάλληλοι για εξαγωγή ελαίου. Η εκτίμηση της θρεπτικής αξίας των σπόρων βασίζεται σε διάφορα κριτήρια, όπως είναι η σχέση υδατανθράκων-πρωτεϊνών, η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε απαραίτητα αμινοξέα και το είδος των λιπαρών οξέων (Ξανθόπουλος 1993). Οι μικροί σπόροι με μεγάλη περιεκτικότητα σε έλαιο προορίζονται για την παραγωγή ηλιελαίου. Η καταλληλότητα του παραγόμενου ηλιελαίου για διαφορετικές χρήσεις καθορίζεται από τη σύσταση του σε λιπαρά οξέα και τη περιεκτικότητα του σε αντιοξειδωτικά. Η σύνθεση του ηλιελαίου εξαρτάται από το γονότυπο και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο ηλίανθος με βάση τη σύσταση του ελαίου του διακρίνεται σε συμβατικό με περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ 14%-39%, mid- oleic με περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ 42%-72% και high-oleic με περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ 75%-91% (Codex Alimentarius Committee, 2005). Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το ελαϊκό (18:1) και το λινελαϊκό οξύ (18:2), είναι χρήσιμα για τον ανθρώπινο οργανισμό καθώς έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν τη χοληστερόλη και τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών προβλημάτων.

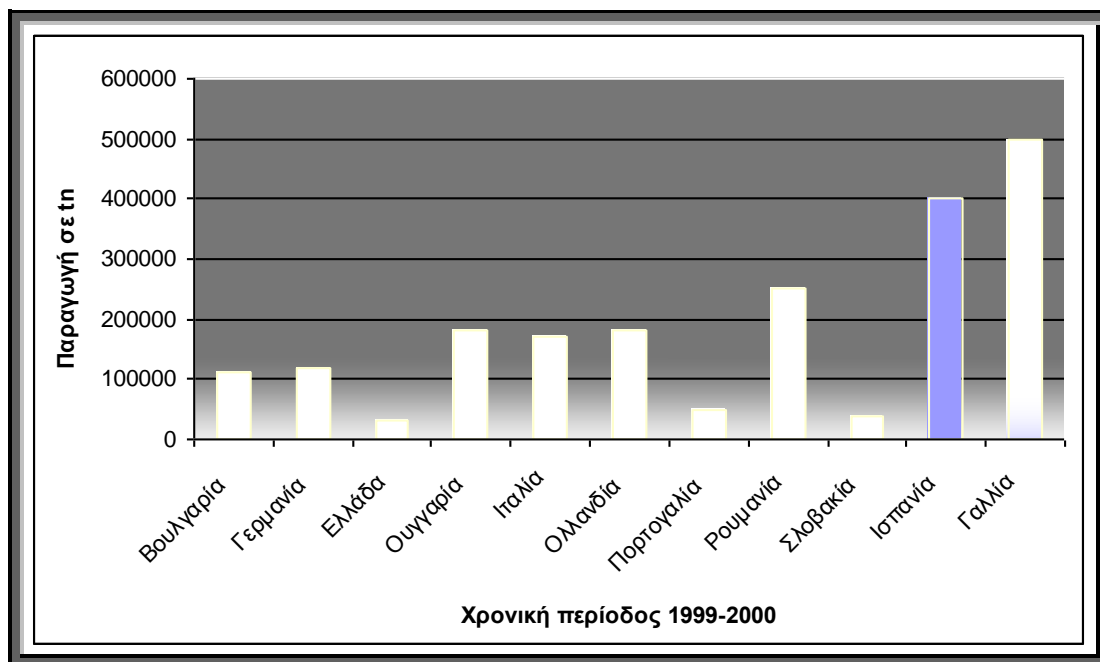
1.1.4. Τάσεις στη παραγωγή του Ηλιελαίου

Η παραγωγή ηλιελαίου παρουσιάζει αυξητικές τάσεις τα τελευταία χρόνια και η παγκόσμια παραγωγή σύμφωνα με το γράφημα ξεπερνάει τα 10 εκατ. tn σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία του FAO (2010). Η Ευρώπη δίνει πάνω από το 60% της παγκόσμιας παραγωγής και τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει ανοδικές τάσεις.

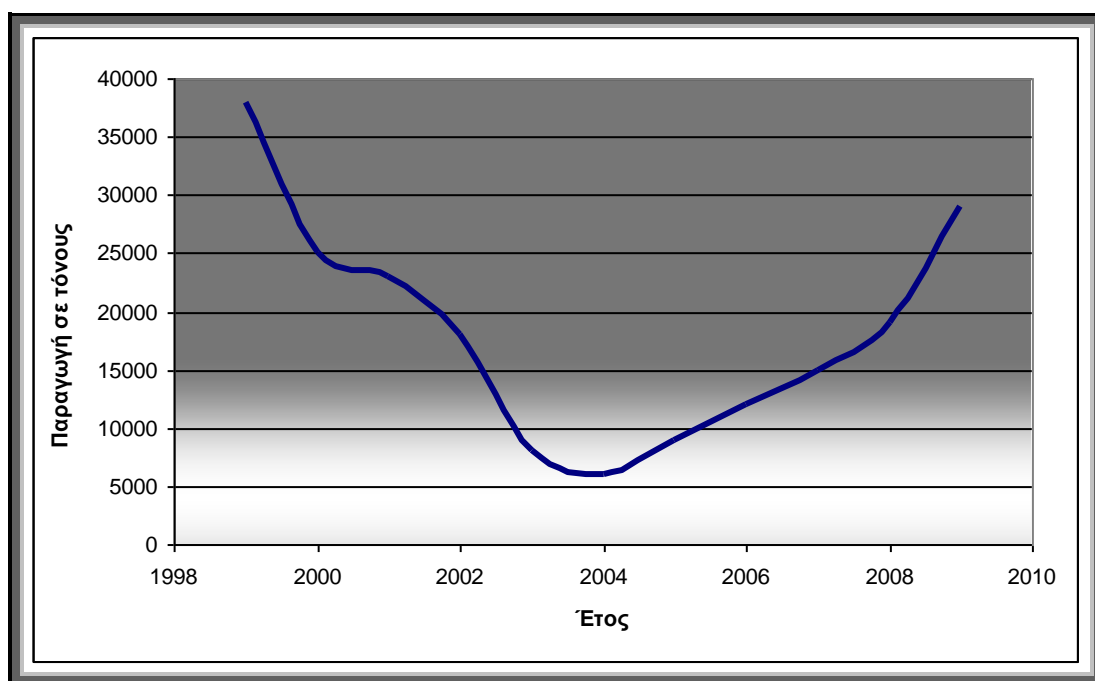


Σχήμα 1. Παραγωγή ηλιέλαιου σε τόνους σε Ευρώπη, Αμερική, Ασία, Αφρική και Ωκεανία κατά μέσο όρο για τα έτη 1999 έως 2003 και 2004 έως 2008 (πηγή FAO, 2010).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή ηλιελαίου είναι η Γαλλία, Ισπανία και η Ρουμανία με παραγωγή κατά μέσο όρο τη τελευταία δεκαετία 491.078, 402.888 και 278.525 τόνους ανά έτος αντίστοιχα. Ακολουθούν η Ολλανδία, Ουγγαρία, Ιταλία, Γερμανία και Βουλγαρία. (FAO, 2010)



Σχήμα 2. Παραγωγή ηλιελαίου στις χώρες της Ε.Ε. κατά μέσο όρο τη δεκαετία 1999 έως 2008 (πηγή: FAO, 2010).



Σχήμα 3. Παραγωγή ηλιελαίου σε τόνους στην Ελλάδα από το 1999 έως το 2009 (πηγή: Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και τροφίμων)

Πίνακας 3. Μέση σύνθεση των οξέων του ηλιελαίου

<i>Παλμιτικό οξύ</i>	<i>3-10%</i>
<i>Στεαρικό οξύ</i>	1-10%
<i>Αραχιδονικό</i>	0,5-1,5%
<i>Ελαιϊκό οξύ</i>	14-35%
<i>Λινολενικό οξύ</i>	< 0,3%

Πίνακας 4. Φυσικές και χημικές σταθερές του ηλιελαίου

<i>Δείκτης διαθλάσεως (25°C)</i>	<i>1,4709-1,4749</i>
<i>Ειδικό βάρος (15°C)</i>	0,920-0,927
<i>Ιξώδες κατά Engler (25°C)</i>	8,2
<i>Σημείο πήξεως</i>	-16 έως -18 °C
<i>Αριθμός σαπωνοποίησης</i>	186-194
<i>Αριθμός ιωδίου</i>	127-136
<i>Αριθμός Ακετυλίου</i>	14,5
<i>Μέσο μοριακό βάρος των λιπαρών του οξέων</i>	280-287
<i>Ασαπωνοποίητα συστατικά</i>	0,5-1,3%

1.2. Ελαιόλαδο- Ελιά

1.2.1. Ιστορική αναδρομή

Εδώ και χιλιάδες χρόνια η ελιά και ο καρπός της «ζει» στην περιοχή της Μεσογείου. Το πολύτιμο αυτό δώρο της φύσης είναι μια ζωντανή κληρονομιά, που συνδέεται με πολλούς τομείς της ζωής μας. Το ελαιόλαδο τρέφει, συντηρεί, προστατεύει, τονώνει, θεραπεύει και εμπνέει.

Ελαιόλαδο (ή απλώς λάδι) ονομάζεται στα Ελληνικά το λάδι που προέρχεται από τους καρπούς της ελιάς. (wikipedia, oils)

Όλοι γνωρίζουμε ότι από τον καρπό της ελιάς παίρνουμε το ελαιόλαδο. Αυτό είναι και το πιο γνωστό προϊόν της ελιάς, αφού αποτελεί απαραίτητο συστατικό της καθημερινής μας διατροφής. Όμως υπάρχουν και άλλα προϊόντα της ελιάς που δεν είναι και τόσο γνωστά όπως για παράδειγμα το πράσινο σαπούνι που παράγεται από το πυρήνα της ελιάς. Πιο παλιά το ελαιόλαδο χρησιμοποιείτο για τη συντήρηση των τροφών, σαν φάρμακο και σαν λιπαντικό στις μηχανές. Επιπλέον, το χρησιμοποιούσαν και ως καύσιμο στις λάμπες λαδιού.

Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η ελιά συνδέεται με την ιστορία μας. Από την αρχαιότητα ήταν γνωστή η συμβολή της στην εξέλιξη της οικονομίας και του πολιτισμού μας. Ήταν ιερό δέντρο της πόλης της Αθήνας και λατρευτικό σύμβολο των αρχαίων Ελλήνων και του Χριστιανισμού. Σύμφωνα με τη μυθολογία, η θεά Αθηνά πρόσφερε την ελιά στους Αθηναίους ως σύμβολο γονιμότητας για να κερδίσει την εύνοιά τους στον ανταγωνισμό της με το θεό Ποσειδώνα, σχετικά με το ποιος θα έδινε το όνομά του στην πόλη. Μετά το βιβλικό κατακλυσμό, παρέλαβε ο Νώε ένα κλαδί ελιάς από ένα περιστέρι που σήμαινε ότι η ανθρώπινη ζωή θα ξανάρχιζε στη γη. Επιπλέον ήταν σύμβολο των ολυμπιακών ιδεωδών, της Ειρήνης και της Σοφίας και το μοναδικό βραβείο που έπαιρνε ο Ολυμπιονίκης (www.vieltha.com/olives)

Στην Πορτογαλία υπάρχουν προσευχές για να διώξουν το δαιμόνιο. Σε αυτές αναφέρεται το ελαιόλαδο σαν μέσο που εξαγνίζει το κακό και σε αρκετές αγροτικές περιοχές οι άνθρωποι πετούν λάδι στο έδαφος για να έχουν καλή σοδειά ή για να ευχαριστήσουν για την καλή σοδειά που είχαν.

Ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της ιατρικής, πίστευε στις θεραπευτικές ιδιότητες του ελαιολάδου. Αναφερόταν σε αυτό σαν την «ιδανική θεραπεία». Οι αρχαίοι Έλληνες θεραπευτές χρησιμοποιούσαν ελαιόλαδο για να επουλώσουν πληγές, για να θεραπεύσουν την αϋπνία, τη ναυτία, τη χολέρα. Οι σύγχρονοι επιστήμονες πιστεύουν ότι βοηθά τις λειτουργίες του εγκεφάλου, των εσωτερικών μας οργάνων και ιδιαίτερα της καρδιάς, αφού προλαβαίνουν και παίρνουν τη θέση από τα βλαβερά ζωικά λίπη, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη συγκέντρωση λίπους στην καρδιά και οδηγούν στο έμφραγμα.

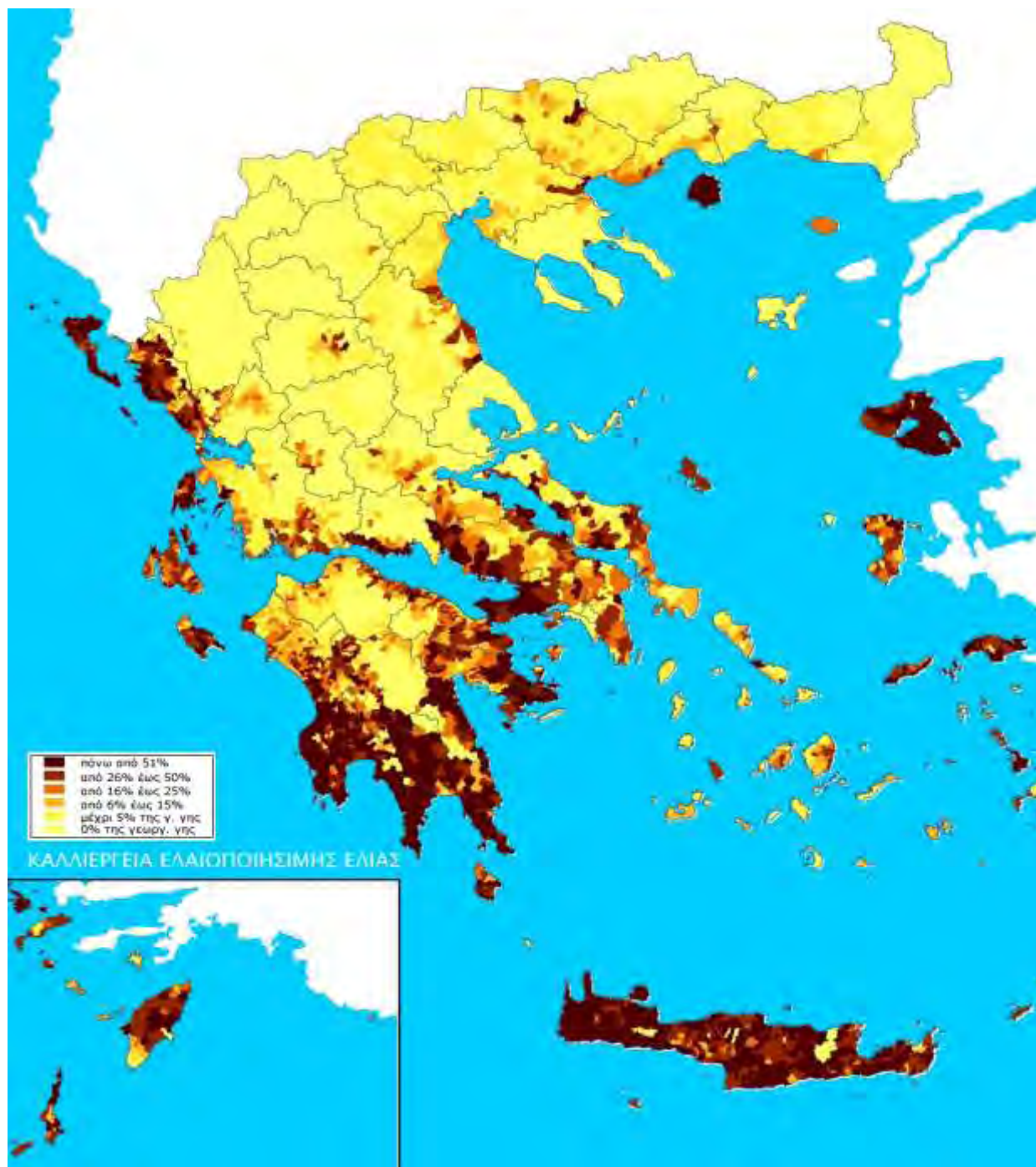
Το ελαιόλαδο θεωρείται προϊόν υγιεινής διατροφής λόγω της περιεκτικότητάς του σε μονοακόρεστα λιπαρά. Εξάγεται με έκθλιψη των ελιών, οι οποίες πρέπει να συλλέγονται πριν από την τελική τους ωρίμανση, όταν δηλαδή έχουν χρώμα πράσινο-βιολετί, καθώς η ποιότητα του λαδιού τους είναι πολύ καλύτερη από αυτήν του λαδιού που εξάγεται από τους τελείως ώριμους καρπούς. Οι ελιές συλλέγονται με τα χέρια ή όταν είναι τελείως ώριμες, με τσίναγμα του δέντρου. Αποθηκεύονται σε ξύλινα δοχεία ή σε σωρούς, σε καλά αεριζόμενους χώρους για να αποφευχθεί η ζύμωση. Το λάδι παράγεται στα ελαιουργεία, με ψυχρή ή θερμή συμπίεση καρπού ελιάς. Σε αρκετές περιπτώσεις, στη συνέχεια γίνεται φιλτράρισμα με διηθητικά μέσα.

1.2.2. Συστηματική Κατάταξη – Βοτανικά Χαρακτηριστικά Ελιάς

Η ελιά είναι αειθαλής, αιωνόβιο καρποφόρο δέντρο και ανήκει στη βοτανική οικογένεια Oleaceae. Στο γένος *Olea*, μόνον η *Olea europaea* έχει οικονομικό ενδιαφέρον. Υπάρχουν δυο παραλλαγές του γένους η άγρια ελιά (*Olea europaea* var. *Oleaster*) και η καλλιεργούμενη (*Olea europaea* var. *sativa*). Φυσικά οι ποικιλίες και οι τύποι ελιάς είναι πάρα πολλοί και δημιουργήθηκαν είτε από την προσαρμογή του δέντρου στις ειδικές κλιματολογικές και εδαφικές συνθήκες του κάθε τόπου είτε σε μεταλλαγές και στο φυσικό πολλαπλασιασμό του είτε στον άνθρωπο (Fooks, 1995).

Το γένος *Olea* περιλαμβάνει τουλάχιστον 30-35 είδη που ανήκουν στην Οικογένεια *Oleaceae*, της υποοικογένειας *Oleoideae*. Η καλλιεργούμενη ελιά (*Olea europaea* L.) είναι αείφυλλο δένδρο που προήλθε από τροπικά και υποτροπικά είδη. Παλαιοντολογικά ευρήματα από είδη ελιάς βρέθηκαν στην Ιταλία, Γαλλία κ.ά. χώρες. Η τεταρτογενής Μεσογειακή ζώνη βρίσκονταν μέσα σε τροπική ζώνη, αλλά η ξηρασία και οι παγετώνες στην πλειστόκαινο περίοδο απετέλεσαν τρόπους φυσικής επιλογής για σκληρόφυλλα φυτά με ικανότητα αποφυγής των παγετώνων. Αυτός ήταν πιθανόν και ο βασικός λόγος μείωσης του πληθυσμού της ελιάς και μόνο φυτά με ικανότητα επιβίωσης σε -5°C έως -12°C επέζησαν ενώ σε θερμοκρασίες $<-12^{\circ}\text{C}$ καταστράφηκαν.

Η ελιά που προήλθε από την ανατολική λεκάνη είναι μια από τις αρχαιότερες καλλιέργειες. Στην οικογένεια αυτή υπάρχουν 30 γένη όπου συμπεριλαμβάνονται και κάποια καλλωπιστικά είδη, βέβαια οι πιο πολλές καλλιέργειες ανήκουν στο είδος *Olea europaea*.



Εικόνα 1. Καλλιέργεια ελαιοποιήσιμης ελιάς στην Ελλάδα (ΕΛ.ΣΤΑΤ. 2007)

Συνολική γεωργική γη 37.000 χιλ. στρ.

Έκταση καλλιέργειας 6.608 χιλ. στρ.

Παραγωγή ελαιοποιήσιμης ελιάς 2.019 χιλ. τόνοι

Ποσοστό κάλυψης γεωργικής γης 17,9%

1.2.3. Τρόπος παραγωγής του ελαιολάδου

Τα σύγχρονα ελαιουργεία είναι ανεξάρτητες βιομηχανίες οι οποίες διαθέτουν άφθονο νερό για τον καθαρισμό και την επεξεργασία των ελιών. Οι διάφοροι χώροι του ελαιουργείου αερίζονται καλά, είναι στεγνοί και έχουν θερμική μόνωση. Υπάρχουν, ωστόσο, ορισμένα μικρά ελαιουργεία προσαρτημένα στα αγροκτήματα, όπου η επεξεργασία γίνεται με τα παραδοσιακά συστήματα τα οποία οι αγρότες τα ονομάζουν *λιαρούβια* ή *λιοτρίβια*.

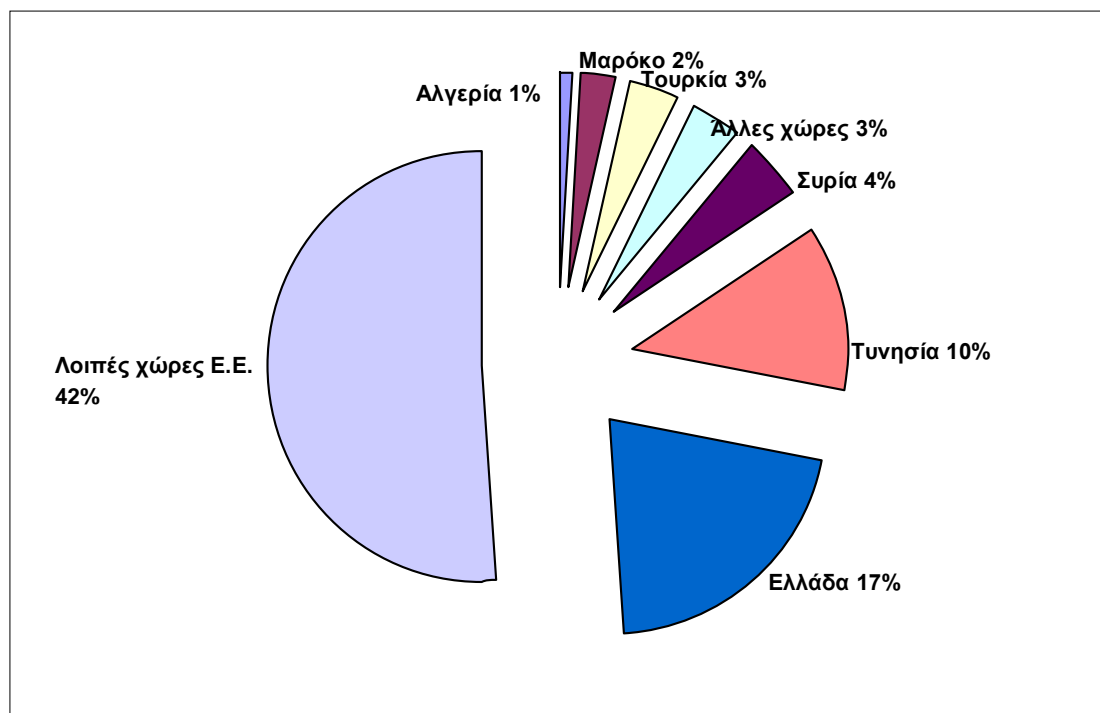
Στα ελαιουργεία η επεξεργασία αρχίζει με το ζύγισμα, τον διαχωρισμό και το πλύσιμο των ελιών. Οι ελιές, που έχουν τοποθετηθεί σε ξύλινα τελάρα μεταφέρονται με αναβρόχια σε μια μεγάλη λεκάνη η οποία βρίσκεται σε ένα ύψωμα του ελαιουργείου. Από εκεί πέφτουν με χοανοειδείς αγωγούς στο ελαιοτριβείο, που αποτελείται από θραυστήρες ή μυλόλιθους. Μετά την πρώτη σύνθλιψη και έκθλιψη εξάγεται το πρώτο λάδι και παραμένει ο ελαιοπολτός. Ο ελαιοπολτός μεταφέρεται σε ένα δεύτερο ελαιοπιεστήριο (πίεση με ανερχόμενο κύλινδρο), από το οποίο εξάγεται το δεύτερο λάδι. Τέλος, πραγματοποιείται μια τρίτη έκθλιψη, από την οποία συγκεντρώνονται σε λεκάνες τα υπολείμματα του ελαιοκάρπου (πυρήνα ή ελαιοπλακούντες). Στη συνέχεια, ο πυρήνας διοχετεύεται σε λέβητες, όπου αναδεύεται και θερμαίνεται έως τους 80-90 βαθμούς Κελσίου. (Κυριτσάκης, 1988)



Εικόνα 2. Ελιές για ελαιοποίηση (www.elais.gr)

Στο στάδιο αυτό, με τη βοήθεια ισχυρών υδραυλικών πιεστηρίων, εξάγεται και άλλο λάδι από τους ελαιοπλακούντες (πυρήνα), το οποίο καθορίζεται από το ίζημα (μούργα) με αυτόματο διαχωρισμό μέσα σε δεξαμενές (λίμπες, υπολήνια) και, κατόπιν, σε ταχύστροφους φυγοκεντρικούς ελαιοδιαχωριστήρες. Στα ελαιουργεία υπάρχουν επίσης δεξαμενές όπου συγκεντρώνονται οι μούργες και τα νερά του πλυσίματος των ελιών. Αυτά, αφού παραμείνουν στις δεξαμενές περίπου για 20 ημέρες, περνούν από φυγοκεντρικό διαχωριστήρα και δίνουν πυρηνέλαια που είναι κατάλληλα για την παρασκευή σαπουνιών. Τα υγρά υπολείμματα (*κατσίγαρος*) αποξηραίνονται και χρησιμοποιούνται ως λιπάσματα, ως νομή ζώων ή ως καύσιμη ύλη. Στην τελευταία αυτή περίπτωση συσπειρώνονται με πίσσα σε κύβους, σε θερμοκρασία 70°C (Θερίος, 2005).

Ανάλογα με τον τύπο του μηχανικού εξοπλισμού, το σύστημα επεξεργασίας, την ποιότητα και την εποχή της συγκομιδής των ελιών, μπορούν να προκύψουν στα ελαιουργεία διαφορετικά δευτερεύοντα προϊόντα ή διαφορετικό λάδι από τις πυρήνες (πυρηνέλαιο), από τις ζυμωμένες ελιές, από τα υπολείμματα της σάρκας των καρπών κλπ. Τα ελαιόλαδα που κυκλοφορούν στο εμπόριο διακρίνονται σε φυσικά βρώσιμα και σε βιομηχανικά. Τα πρώτα διακρίνονται σε αγουρέλαια και σε έλαια πρώτης, δεύτερης ή τρίτης ποιότητας. Η μέση απόδοση από 100 κιλά ελιών, που κυμαίνεται ανάλογα με την ποιότητα, το έτος και το σύστημα επεξεργασίας, είναι περίπου 15-25 κιλά λάδι, 35-50 κιλά ελαιοπυρήνα και 35-50 κιλά υπολείμματα. (Κυριτσάκης, 1988)



Σχήμα 4. Διεθνής παραγωγή ελαιολάδου (1999/2000) σε τόνους
Σύνολο 2.033.500 (Θερίος, 2005)

1.2.4. Ποιότητα ελαιολάδου- Κατηγορίες

Σύμφωνα με την ισχύουσα ποιοτική κατάταξη «παρθένο ελαιόλαδο» είναι: το έλαιο που λαμβάνεται μόνο με μηχανικές μεθόδους ή άλλες φυσικές επεξεργασίες, με συνθήκες που δεν προκαλούν αλλοίωση του ελαίου και τα οποία δεν έχουν υποστεί καμία άλλη επεξεργασία, πλην της πλύσης, της μετάγγισης, της φυγοκέντρωσης και της διήθησης. Εξαιρούνται τα έλαια που λαμβάνονται με διαλύτες, με βοηθητικές ύλες παραλαβής που έχουν χημική ή βιοχημική δράση, ή με μεθόδους επανεστεροποίησης ή πρόσμιξης με έλαια άλλης φύσης. Επομένως, το «παρθένο ελαιόλαδο» είναι το λάδι ‘φυσικός χυμός’, το οποίο περιέχει ανέπαφα όλα τα βασικά συστατικά που περιείχε και μέσα στον ελαιόκαρπο (βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, μικροστοιχεία κτλ) και κατ’ επέκταση εκείνο που έχει όλες τις ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες. (Wikipedia, oils)

Κατά τον Ενιαίο Φορέα Ελέγχου Τροφίμων, "Ελαιόλαδο" χαρακτηρίζεται το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της Ελιάς της Ευρωπαϊκής (*Olea europaea*) με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες οπωσδήποτε φυσικές, σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου. Σύμφωνα με τη σχετική νομοθεσία (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Αγορανομικός Κώδικας και Κανονισμός (ΕΚ) 1513/2001 όπως τροποποίησε τον Κανονισμό 133/1966 (ΕΟΚ)) που ορίζει την ονομασία των ελαιόλαδων, τα είδη του διακρίνονται σε:

- Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο (οξύτητα $\leq 0,8\%$)
- Παρθένο Ελαιόλαδο (οξύτητα $\leq 2,0\%$)
- Ελαιόλαδο Λαμπάντε (οξύτητα $> 2,0\%$) (είναι ακατάλληλο για κατανάλωση ως έχει και προορίζεται για ραφινάρισμα ή για βιομηχανική χρήση).

1.2.5. Πως εξασφαλίζουμε καλό ελαιόλαδο

Τα πάντα ξεκινούν από τις εδαφοκλιματολογικές συνθήκες. Το δέντρο της ελιάς χρειάζεται γενικά ασβεστώδη εδάφη σε θερμές και ξηρές περιοχές με ήπιο χειμώνα και μεγάλη ηλιοφάνεια σε όλη τη διάρκεια του έτους. Αναπτύσσεται καλύτερα σε γόνιμο έδαφος, αλλά παρουσιάζει μεγάλη αντοχή και σε άγονα, ξερά και πετρώδη εδάφη. Για να καρποφορήσει και να δώσει ελαιόλαδο με έντονα αρωματικά και πλούσια γευστικά χαρακτηριστικά, είναι απαραίτητη και η ανάλογη ποικιλία ελαιόδεντρου, η οποία πρέπει να ταιριάζει με το έδαφος στο οποίο καλλιεργείται. Εξίσου σημαντικά στοιχεία για τη διατήρηση της ποιότητας του λαδιού, δηλαδή της υψηλής θρεπτικής και βιολογικής του αξίας, είναι ο χρόνος και τρόπος συγκομιδής του καρπού, όσο και ο τρόπος επεξεργασίας και φύλαξής του. Το ελαιόλαδο μετά την παραγωγή του πρέπει να διατηρείται σε χώρους δροσερούς και σε ανοξείδωτα δοχεία για να αποφεύγεται η οξείδωσή του, που δίνει ανεπιθύμητη γεύση και οσμή και υποβαθμίζει με αυτό τον τρόπο τη θρεπτική του αξία. Η

πολύχρονη εμπειρία έχει δείξει ότι με βάση τα στοιχεία αυτά προκύπτει άριστη ποιότητα ελαιολάδου, τόσο από την πλευρά της διατροφικής αξίας, όσο και από την άποψη της γευστικής ικανοποίησης. (www.elais.gr)

Κριτήρια προσδιορισμού της ποιότητας του ελαιολάδου

- Οξύτητα :Αποτελεί το πιο βασικό κριτήριο αξιολόγησης του ελαιολάδου. Σύμφωνα με την οξύτητα διακρίνεται σε βρώσιμο και βιομηχανικό
- Οξείδωση:Ο προσδιορισμός γίνεται με τη μέτρηση των υπεροξειδίων ή την απορρόφηση στο υπεριώδες φάσμα.
- Χρώμα. Το είδος των λιποδιαλυτών χρωστικών καθορίζει το χρώμα και αποτελεί βασικό κριτήριο ποιοτικής αξιολόγησης. Η γεύση εξαρτάται από τη παρουσία πτητικών συστατικών καθώς και από τα λιπαρά οξέα, κυρίως το ελαϊκό, λινελαϊκό και τις πολυφαινόλες.
- Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Κυριτσάκης, 1988)

1.2.6. Χημική σύσταση ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο, όπως όλα τα φυτικά έλαια αποτελείται από σαπωνοποιήσιμο κλάσμα (τριγλυκερίδια) και ένα μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα. (δευτερεύοντα συστατικά).

Το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα αντιστοιχεί στο 99% του ελαίου. Τα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των τριγλυκεριδίων του ελαιολάδου ποικίλουν, και εν μέρει εξαρτώνται από την περιοχή από την οποία προέρχεται.

Πίνακας 5. Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα (%) (www.elais.gr)

(%) Τα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου	Περιεκτικότητα %
Ελαϊκό οξύ	56,0 - 83,0
Παλμιτικό οξύ	7,5 - 20,0
Λινελαϊκό οξύ	3,5 - 20,0
Στεατικό οξύ	0,5 - 5,0
Παλμιτολεϊκό οξύ	0,3 - 3,5
Λινολενικό οξύ	0,0 - 1,5

1.2.7. Διατροφική αξία ελαιολάδου – Υγεία

Το ελαιόλαδο είναι ένα τυπικό φαγητό της <<μεσογειακής διατροφής>>. Χάρη στη βέλτιστη σύνθεση του σε λιπαρά οξέα και στην εύκολη πεπτικότητα του, έχει υψηλή βιολογική και θρεπτική αξία.

Το ελαιόλαδο ως είδος διατροφής αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας και άλλων θρεπτικών ουσιών που παίζουν σπουδαίο ρόλο στην υγεία. Ένα γραμμάριο λαδιού παράγει 9,3 Kcal (χιλιοθερμίδες). Κύριο συστατικό της μεσογειακής διατροφής είναι το ελαιόλαδο η θρεπτική αξία του οποίου είναι πλέον αναμφισβήτητη. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση ελαιολάδου σαν μέρος μίας υγιεινής διατροφής και ενός υγιεινού τρόπου ζωής γενικότερα μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη ή και αντιμετώπιση διαφόρων νοσημάτων.

1. Καρδιοπροστατευτική δράση : Συμβάλλει στη μείωση της κακής (LDL) χοληστερόλης στο αίμα χωρίς να μειώνει την καλή (HDL) χοληστερόλη, έχει αντιθρομβωτική δράση, ενώ πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι μπορεί να συμβάλλει και στη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Ο οργανισμός Food and Drug Administration (FDA) των ΗΠΑ έχει εκδώσει ανακοίνωση με την οποία υποστηρίζει ότι η ημερήσια κατανάλωση 2 κουταλιών της σούπας ελαιόλαδο μπορεί να συμβάλλει στη μείωση των πιθανοτήτων για εμφάνιση στεφανιαίας νόσου.

2. Πρόληψη για εμφάνιση καρκίνου : Η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση του ελαιολάδου φαίνεται να προστατεύει από διάφορες μορφές καρκίνου όπως του μαστού και του παχέος εντέρου μέσα από διάφορους μηχανισμούς. Πολλές έρευνες πραγματοποιούνται πάνω στο θέμα αυτό και τα επόμενα χρόνια αναμένεται να μάθουμε περισσότερα σχετικά με τον τρόπο που μπορεί το ελαιόλαδο να προστατεύσει ή και να συμβάλλει στη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου.

3. Αντιγηραντικές ιδιότητες και προστασία από χρόνιες παθήσεις : Το ελαιόλαδο χάρη στην πλούσια αντιοξειδωτική του δράση συμβάλλει στη μείωση της δημιουργίας ελεύθερων ριζών, οι οποίες εμπλέκονται στην εξέλιξη διάφορων χρόνιων ασθενειών και στην γήρανση.

4. Ομαλή λειτουργία του πεπτικού συστήματος: Η κατανάλωση ελαιολάδου συμβάλλει στην ομαλή λειτουργία του πεπτικού συστήματος με διάφορους μηχανισμούς.

1.2.8. Επικίνδυνες προσμίξεις στο ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο είναι προϊόν με υψηλή θρεπτική αξία που μπορεί όμως να μολυνθεί με επικίνδυνες για την ανθρώπινη υγεία ενώσεις κατά τα διάφορα στάδια παραγωγής, εξευγενισμού, τυποποίησης και εμπορίας του (Θεριός,2005).

Τέτοιες ενώσεις είναι:

1. *Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων:* Οφείλονται στη μη ορθή εφαρμογή της φυτοπροστασίας και ιδιαίτερα στο στάδιο προ της ωρίμανσης του ελαιοκάρπου.

2. *Οι πτητικοί αλογονωμένοι διαλύτες* (Τετραχλωροαιθυλένιο, FREON, τριχλωροαιθάνιο και τριχλωροαιθυλένιο). Η παρουσία FREON σε ελαιόλαδο οφείλεται σε διαρροές ψυγείων που βρίσκονται κοντά σε ελαιουργεία ή τυποποιητήρια ελαιολάδου.

3. *Τα βαρέα μέταλλα,* η παρουσία των οποίων στο λάδι οφείλεται στην επαφή τους με τα μεταλλικά μέρη των μηχανημάτων ή των δεξαμενών κατά τα στάδια της παραγωγής ή αποθήκευσης του ελαιολάδου.

4. Η παρουσία πολυκυκλικών και αρωματικών υδρογονανθράκων κυρίως στα πυρηνέλαια, έχει σχέση με τον τρόπο παραγωγής τους.

5. Οι περιβαλλοντικοί ρυπαντές όπως διοξίνες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια και αρωματικοί υδρογονάνθρακες (βενζόλιο, τολουόλιο κ.λπ.).

6. Επιβλαβείς ενώσεις προστίθενται στα λάδια από τις φιάλες από ακατάλληλο υλικό όπως βενζυλοχλωρίδιο.

7. Παρουσία ξένων σωμάτων όπως τεμάχια γυαλιού, πλαστικών, μετάλλων και ρύπων.

1.3. Καλαμποκέλαιο- Καλαμπόκι

1.3.1. Ιστορική αναδρομή

Το καλαμπόκι ή αραβόσιτος (*Zea mays*) είναι σιτηρό της οικογένειας των Ποσειδών (*Poaceae*) ή Αγρωστωδών (*Gramineae*) και κατάγεται από την Αμερικάνικη ήπειρο όπου ήδη πριν από 5.500 χρόνια το καλλιεργούσαν οι Ίνκας, οι Μάγια και οι Αζτέκοι. Η Ελληνική ονομασία του, «αραβόσιτος», σημαίνει «η σίτος (σιτάρι) των Αράβων» και εισήχθη στην Ελλάδα το 1600 από τη Βόρεια Αφρική.

1.3.2. Συστηματική Κατάταξη – Βοτανικά Χαρακτηριστικά Καλαμποκιού

Είναι ετήσιο, ψηλό φυτό με χοντρό όρθιο και συμπαγή βλαστό, στενά και μακριά φύλλα σε σχήμα σπαθιού και κυματιστά άκρα. Στην κορυφή του φυτού υπάρχει η αρσενική ταξιανθία που σχηματίζει θύσανο, έχει δε την ονομασία *φόβη*. Η θηλυκή ταξιανθία αποτελείται από ένα πλατύ στάχυ με παχύ άξονα, πάνω στον οποίο βρίσκονται τα άνθη σε σειρές. Η ταξιανθία αυτή ονομάζεται *σπάδικας*. Στη συνέχεια τη θέση των ανθών παίρνουν

οι κόκκοι που καλύπτονται από φύλλα ενώ στη κορυφή του σπάδικα υπάρχει θύσανος αποτελούμενος από πολλές μακριές τριχοειδείς κλωστές (www.medreha.gr).

1.3.3. Χρήσεις καλαμποκιού

Παρότι το καλαμπόκι είναι βασική πηγή διατροφής σε πολλές χώρες, η θρεπτική του αξία είναι μικρότερη απ' ό τι στα άλλα σιτηρά. Επίσης το ψωμί που παράγεται από το καλαμπόκι, γνωστό με το όνομα μπομπότα, δεν είναι καλής ποιότητας. Το άμυλο καλαμποκιού (γνωστό και ως *κορν φλάουρ* ή *άνθος αραβοσίτου*) χρησιμοποιείται στη ζαχαροπλαστική, στην παραγωγή αμυλούχων προϊόντων και στην αλλαντοποιία. Στη Λατινική Αμερική το καλαμπόκι χρησιμοποιείται ως βάση ενός είδος ζύμης από την οποία παρασκευάζονται οι «τορτίγιας», επίπεδες πίτες που αντικαθιστούν το ψωμί.

Στη διατροφή επίσης χρησιμοποιείται και το λάδι του καλαμποκιού, το γνωστό αραβοσιτέλαιο.

1.3.4. Διατροφική αξία Αραβοσιτέλαιου– Υγεία

Το αραβοσιτέλαιο ή καλαμποκέλαιο ως είδος διατροφής αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας όπως και το ελαιόλαδο. Παρόλο που η κατανάλωση του από τις επιχειρήσεις εστίασης είναι αρκετά χαμηλότερη σε σχέση με το ηλιέλαιο και το ελαιόλαδο, ωστόσο, υπάρχουν ακόμη κάποιοι επαγγελματίες που το επιλέγουν κυρίως για λόγους κόστους.

Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση καλαμποκέλαιου σαν μέρος μίας υγιεινής διατροφής και ενός υγιεινού τρόπου ζωής γενικότερα μπορεί να συμβάλλει στην πρόληψη ή και αντιμετώπιση διαφόρων νοσημάτων όπως

- Προστατεύει την καρδιά
- Μαχητής του καρκίνου: το καλαμπόκι περιέχει βήτα-κρυπτοξανθίνη (cryptoxanthin), ένα καροτενοειδές με αντιοξειδωτικές ιδιότητες που μπορεί να σχετίζεται

με μειωμένο κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα. Ως μέρος της μελέτης που δημοσιεύεται στο Cancer Epidemiology, πάνω από 63.000 ενήλικες στη Σαγκάη της Κίνας, παρακολουθήθηκαν για 8 χρόνια και τα στοιχεία του τρόπου ζωής τους συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκαν. Από την έρευνα προέκυψε ότι έτρωγαν τροφές πλούσιες σε cryptoxanthin και παρουσίασαν 27% μείωση του κινδύνου εκδήλωσης καρκίνου του πνεύμονα.

- Αποτρέπει την αναιμία: περιέχεται βιταμίνη B12 που προλαμβάνει την αναιμία που προκαλείται από ανεπάρκεια σιδήρου.

- Βοηθάει στην όραση: περιέχει β καροτίνη

- Είναι καλό για τους διαβητικούς: το καλαμπόκι ανήκει στη πυραμίδα των τροφίμων μαζί με άλλα τρόφιμα (www.medreha.com)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2- ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΚΑΙ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

2.1. Ιστορική αναδρομή

Τα φυτοφάρμακα ή αλλιώς φυτοπροστατευτικά προϊόντα αναπτύχθηκαν τα τελευταία εξήντα περίπου χρόνια. Το 1942 ο Ελβετός Muller ανακαλύπτει το DDT, ενώ το 1946 τα εργαστήρια της εταιρίας φαρμάκων BAYER κατασκευάζουν το παραθείο. Την ίδια περίοδο χρησιμοποιήθηκε το DDT για τη προστασία της γεωργικής παραγωγής στην Ελβετία ενώ αρκετά άλλα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα παρασκευάστηκαν στη Γερμανία. Έως το 1970 η χρήση των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων ήταν ιδιαίτερα εντατική, ενώ τέθηκαν σε κυκλοφορία τα πρώτα συνθετικά πυρεθρινοειδή εντομοκτόνα. (Ιατρού, 2009)

Μετά από παρατεταμένες έρευνες και πειράματα που αφορούσαν ένα μεγάλο εύρος χημικών ενώσεων με εντομοκτόνο δράση, οι οργανοφωσφορικοί εστέρες ήταν εκείνη η ομάδα η οποία εμφάνισε ικανοποιητική δραστικότητα, διάρκεια δράσης, τοξικότητα, ευρύτητα δραστικότητας και ομαλής συμπεριφοράς στα φυτά. Ωστόσο μία άλλη ομάδα οργανοχλωριωμένων υδρογονανθράκων παρουσίασε επιπτώσεις στον άνθρωπο και τα φυτά (Rodriguez- Mozaz et al., 2004).

Τα τελευταία χρόνια καταβάλλεται πολύ μεγάλη προσπάθεια για τη προστασία του περιβάλλοντος και του καταναλωτή από τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων και τις δυσμενείς συνέπειες που έχει η εφαρμογή τους, γίνεται φανερή από την αλλαγή της ίδιας της ονομασίας τους. Τα «γεωργικά φάρμακα» μετονομάστηκαν σε «φυτοφάρμακα» ή «αγροχημικά» και στο τέλος πήραν τη σημερινή ονομασία τους φυτοπροστατευτικά προϊόντα, κάτι που δείχνει την προσπάθεια προστασίας της φύσης και κατ' επέκταση της τροφικής αλυσίδας (Φυτιάνος- Σαμαράς, 2009)

Φυτοπροστατευτικό Προϊόν (Φ.Π) είναι κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών συμπεριλαμβανομένων και επεξεργασμένων ή μη φυτικών προϊόντων, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσον καταπολέμησης των εχθρών και των ασθενειών των φυτών ή να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των εν λόγω ουσιών (Νόμος 721/ 1977). Κάθε Φ.Π

περιέχει την ενεργή ουσία (**Φυτοπροστατευτική Ουσία (Φ.Ο.)**) που είναι υπεύθυνη για τη δράση του, η οποία όμως σπάνια χρησιμοποιείται αυτή καθ' αυτή. Η δραστική ουσία αναμιγνύεται και επεξεργάζεται με τις βοηθητικές ουσίες. Γίνεται δηλαδή τυποποίηση του Φ.Π. που οδηγεί στην παραγωγή του σκευάσματος που εφαρμόζεται στο χωράφι (Καρπούζας, 2003).

Σύμφωνα με τον Ενιαίο Φορέα Ελέγχου Τροφίμων (Ε.Φ.Ε.Τ.) σκεύασμα θεωρείται το μείγμα ή το διάλυμα που αποτελείται από δύο ή περισσότερες ουσίες εκ των οποίων τουλάχιστον η μία είναι δραστική και προορίζεται να χρησιμοποιηθεί ως φυτοπροστατευτικό προϊόν.

Ωστόσο, η απεριόριστη χρήση αυτών των ουσιών σε τόσο μικρό διάστημα επέφερε επιπτώσεις στους ζωντανούς οργανισμούς υπό τη μορφή τοξικότητας καθώς επίσης και εμφάνιση ανθεκτικότητας από τους διάφορους φυτικούς μικροοργανισμούς. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να συσταθούν κάποιοι οργανισμοί ή αρμόδιοι φορείς που δε θα ήταν μόνο υπεύθυνοι για τον έλεγχο των υπολειμμάτων Φ.Ο., αλλά και για τη θέσπιση νομοθεσίας (κοινοτικής νομοθεσίας) που θα αφορά την παραγωγή και τη χρήση.

Τέτοιοι αρμόδιοι φορείς είναι ο FAO (Food Agriculture Organisation), CCPR (Codex Committee on Pesticide Residues), ΕΦΕΤ (Ενιαίος Φορέας Ελέγχου τροφίμων) και ο WHO (World Health Organisation) ή ο ΠΟΥ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας).

Τα θέματα που αφορούν τα Φ.Π. εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης ρυθμίζονται βάσει της οδηγίας 91/414/EEC περί φυτοπροστατευτικών προϊόντων (www.efet.gr).

2.2. Ορισμός υπολειμμάτων στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Ως υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων θεωρούνται ουσίες ή μίγματα ουσιών που βρίσκονται στη τροφή που καταναλώνουν οι άνθρωποι και τα ζώα και προέρχονται από τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται και οι ουσίες που είναι προϊόντα διάσπασης, μεταβολισμού ή χημικής αντίδρασης από τη στιγμή που είναι τοξικολογικά σημαντικές. Πέρα όμως από την παρουσία της ουσίας στο προϊόν είναι σημαντικό και η τοξικότητα της, η οποία διακρίνεται σε οξεία, υποξεία ή υποχρόνια και χρόνια. Η τοξικότητα μιας ουσίας είναι μία ιδιότητα της

ενώ η βλάβη που μπορεί να προκαλέσει είναι θέμα χρήσης της ουσίας. Η εκτίμηση της τοξικότητας μιας ουσίας είναι ένα πολύπλοκο θέμα που απαιτεί πολλές μελέτες (Ambrus, 1999).

Ένας όρος που μας δίνει μία εκτίμηση της τοξικότητας για κάθε ουσία είναι η Ημερήσια Αποδεκτή Δόση (ADI) και ορίζεται ως η ποσότητα της ουσίας σε mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα που μπορεί να καταναλώνει ένας άνθρωπος ή άλλο ζώο για όλη του τη ζωή χωρίς βλάβη της υγείας με βάση τα δεδομένα της επιστήμης. Ο καθορισμός της ADI είναι σχετικά δύσκολος, λόγω της αβεβαιότητας που υπάρχει στο καθορισμό της δόσης ή του επιπέδου που δεν επιφέρει κανένα παρατηρήσιμο αποτέλεσμα που να μπορεί να αξιολογηθεί εφαρμόζοντας όλες τις γνωστές τεχνικές της τοξικολογίας και προφανώς οι οποιεσδήποτε τιμές της ADI θα ανανεώνονται σύμφωνα με τα νέα επιστημονικά δεδομένα (Λέντζα Ρίζου, 1997, Παπαδοπούλου Μουρκίδου, 1991).

Οι τιμές των υπολειμμάτων για δείγματα επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες όπως η δόση, η μέθοδος εφαρμογής, η πυκνότητα του φυτού και η θέση του στο χώρο, το στάδιο ανάπτυξης και οι μετεωρολογικές συνθήκες κατά τη διάρκεια εφαρμογής του φυτοφαρμάκου καθώς και ο χρόνος από την εφαρμογή μέχρι τη δειγματοληψία (Ambrus, 1999).

Για να ελέγχεται εάν τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα χρησιμοποιούνται στις ενδεικνύμενες δόσεις ώστε να προστατευτεί η υγεία των καταναλωτών και να διευκολύνεται το διεθνές εμπόριο, καθιερώθηκε ο όρος Ανώτατο Όριο υπολειμμάτων (MRL, maximum residue level) που εκφράζεται σε mg δραστικής ουσίας/ kg προϊόντος. Για τον καθορισμό του MRL ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος σε κάποιο γεωργικό προϊόν λαμβάνεται υπόψη η τιμή της ADI, το βάρος του ανθρώπου και το ποσοστό συμμετοχής του προϊόντος στην καθημερινή διατροφή μιας ομάδας πληθυσμού. Για το λόγο αυτό τα MRL διαφέρουν ανά χώρα.

2.3. Σημαντικότερες συνέπειες των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στον ελαιόκαρπο - ελαιόλαδο.

Η εφαρμογή της χημικής καταπολέμησης των παρασίτων στις ελαιοκαλλιέργειες είναι η πιο φθηνή μέθοδος φυτοπροστασίας και σε συνδυασμό με την συνολική ισχύουσα πολιτική αγρονομίας και αγροοικολογίας, πολλοί ελαιοκαλλιεργητές κάνουν κατάχρηση των φυτοφαρμάκων για να διασφαλίσουν την παραγωγή τους. Η αλόγιστη αυτή χρήση των παρασιτοκτόνων στις καλλιέργειες συμβάλλει δυναμικά στην μείωση της βιοποικιλότητας των ελαιώνων, στην ρύπανση των επιφανειακών υδάτων και των προϊόντων της ελιάς, ενώ πιθανολογείται και η σημαντική ρύπανση του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα.

Οι εντατικές εφαρμογές των τεχνικών χημικής φυτοπροστασίας προκάλεσαν καταστροφικές συνέπειες στην χλωρίδα και πανίδα των οικοσυστημάτων των ελαιώνων. Ένα άλλο επίσης σημαντικό πρόβλημα που προκύπτει από τη χρήση φυτοφαρμάκων στους ελαιώνες είναι η ρύπανση των επιφανειακών υδάτων αφού οι εντατικές φυτείες στις οποίες και χρησιμοποιούνται οι μεγαλύτερες ποσότητες φυτοφαρμάκων αρδεύονται με αποτέλεσμα την έκπλυση μεγαλύτερων ποσοτήτων φυτοφαρμάκων. Ο έλεγχος των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων των ελαιοκαλλιεργειών στα υπόγεια και επιφανειακά φυσικά ύδατα δεν έχει μελετηθεί αρκετά. Ωστόσο οι υπάρχουσες μελέτες υποδεικνύουν ότι η μεγαλύτερη ρύπανση είναι αυτή των επιφανειακών φυσικών υδάτων .

Το σημαντικότερο ίσως κεφάλαιο της χρήσης των φυτοφαρμάκων στις ελαιοκαλλιέργειες αποτελεί η ύπαρξη των υπολειμμάτων τους στον καρπό των ελαιοποιήσιμων ποικιλιών και η πιθανότητα συγκέντρωσής τους στο ελαιόλαδο, το οποίο εξορισμού παράγεται με φυσικές διεργασίες από τον καρπό της ελιάς και η οργανική λιπαρή φύση του προσφέρεται στην συσσώρευση πολλών τοξικών οργανικών ουσιών. Τα υπολείμματα των ψεκασμών καλύψεως στον ελαιόκαρπο, η ρύπανση του ελαιοκάρπου από τη διασπορά των φυτοφαρμάκων στον ελαιώνα, η επαφή του καρπού με το έδαφος αν η συγκομιδή γίνει από το έδαφος, αλλά και η τυχόν επιμόλυνση του ελαιοκάρπου από όμβρια ύδατα, νερό και εγκαταστάσεις ελαιοτριβείων οδηγεί σε πιθανή συγκέντρωσή του στο ελαιόλαδο αφού κατά μέσο όρο 1 kg ελαιολάδου παράγεται από 4-7 kg ελαιοκάρπου.

Οι περισσότερες έρευνες στην υπολειμματικότητα των γεωργικών φαρμάκων της ελιάς αναφέρονται στα υπολείμματα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (ιδιαίτερα των

fenthion και dimethoate) λόγω της ευρείας χρήσης τους στις ελαιοκαλλιέργειες και περιλαμβάνουν είτε την καταγραφή των υπολειμμάτων στον ελαιόκαρπο και στο ελαιόλαδο μετά από ελεγχόμενες εφαρμογές (supervised trials) φυτοφαρμάκων για την εύρεση των κατάλληλων μεσοδιαστημάτων πριν την συγκομιδή, είτε την καταγραφή των υπολειμμάτων στα προς κατανάλωση προϊόντα στο εμπόριο (ελαιόκαρπος και ελαιόλαδο) για την διασφάλιση της υγείας του καταναλωτή (Αμβράζη 2007).

2.4. Κατηγορίες Φυτοπροστατευτικών Ουσιών

Η ταξινόμηση των Φ.Π. μπορεί να γίνει ανάλογα με τη βιολογική τους δράση ή τη χημική τους δομή. Στην πρώτη περίπτωση, ταξινομούνται σε Μυκητοκτόνα, Εντομοκτόνα, Ζιζανιοκτόνα, Νηματωδοκτόνα, Τρωκτικοκτόνα, Βακτηριοκτόνα, Ακαρεοκτόνα, Μαλακιοκτόνα, Φερομόνες και Ρυθμιστές Ανάπτυξης. Οι δραστικές ουσίες των Φ.Π. κάθε ομάδας ταξινομούνται σε ομάδες σύμφωνα με τη χημική τους δομή, τον τρόπο χρήσης τους και την εξειδικευμένη βιολογική τους δράση. Σύμφωνα με τη χημική τους δομή τα οργανικά Φ.Π. ταξινομούνται σε τέσσερις γενικές ομάδες, οι οποίες είναι τα Οργανοχλωριωμένα, τα Οργανοφωσφορικά, τα Καρβαμιδικά και τα Ποικίλης Χημικής Σύστασης. Στα ποικίλης χημικής σύστασης Φ.Π. περιλαμβάνονται τα Φαινολικά, τα όξινα ζιζανιοκτόνα και τα παράγωγα της ουρίας, οι Δινιτροανιλίνες, τα Πυρεθρινοειδή ή Συνθετικές Πυρεθρίνες, τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα, τα Μερκαπτοϊμικά μυκητοκτόνα και τα μυκητοκτόνα Ιμιδαζολίου και Τριαζολίου.

Οργανοχλωριωμένα: Το πιο γνωστό εντομοκτόνο αυτής της κατηγορίας είναι το *DDT*. Λόγω όμως της μεγάλης τους σταθερότητας και του φαινομένου της βιοσυσσώρευσης που παρουσιάζουν, με την πάροδο του χρόνου άρχισαν να διαπιστώνονται επιπτώσεις στο περιβάλλον. Το κύριο μειονέκτημα είναι ότι δεν αποδομούνται εύκολα, συσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό, περνούν στο γάλα και τα αυγά, με αποτέλεσμα να εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα των ζώων και του ανθρώπου. Έτσι, τη δεκαετία του '70 ξεκίνησε ο περιορισμός της χρήσης τους και σήμερα στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες έχει απαγορευτεί η χρήση τους σε γεωργικές εφαρμογές. Στην Ελλάδα χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα ακόμη μόνο το Endosulfan.

Οργανοφωσφορικά: είναι μια πολυπληθής ομάδα συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων με ευρύ φάσμα δράσης. Οι φυτικοχημικές και βιολογικές τους ιδιότητες τα κατέστησαν ικανά να υποκαταστήσουν σχεδόν πλήρως τα Οργανοχλωριωμένα. Οι βασικές τους ιδιότητες είναι ότι χαρακτηρίζονται από υψηλή εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση, έχουν ευρύ φάσμα δράσης, μικρή υπολειμματική διάρκεια και σχετικά γρήγορη αποδόμηση σε μεταβολικά προϊόντα μη τοξικά για τον άνθρωπο και τα ζώα.

Οι **Καρβαμιδικές ενώσεις** είναι νεότερης γενιάς εντομοκτόνα σε σχέση με τα Οργανοχλωριωμένα και τα οργανοφωσφορικά. Έχουν τον ίδιο μηχανισμό δράσης με τα οργανοφωσφορικά, χωρίς όμως δέσμευση της χολινεστεράσης, αλλά με επιβράδυνση της δράσης της και ως συνέπεια την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης. Επίσης, δεν έχουν ευρύ φάσμα δράσης. Τα περισσότερα από αυτά έχουν υψηλή οξεία τοξικότητα στα θηλαστικά, τα ψάρια και τα πουλιά. Το πιο γνωστό καρβαμιδικό εντομοκτόνο είναι το *carbaryl* (Sevin), το οποίο ήταν το πρώτο καρβαμιδικό εντομοκτόνο που εφαρμόστηκε στη γεωργική πράξη στα μέσα της δεκαετίας του '50 (Καρπούζας, 2003).

Οι **Πυρεθρίνες** αποτελούν την τέταρτη γενιά συνθετικών οργανικών εντομοκτόνων. Είναι παράγωγα της φυσικής πυρεθρίνης I που παραλαμβάνεται από τις ταξιανθίες του φυτού *Tanacetum* (*Chrysanthemum*, *Pyrethrum*). Οι συνθετικές Πυρεθρίνες παρουσιάζουν φωτοσταθερότητα, ιδιότητα που τους προσδίδει μεγαλύτερη υπολειμματική διάρκεια. Επιπλέον έχουν μεγαλύτερη εντομοτοξική δράση, δηλαδή μείωση της δόσης της δραστικής ουσίας και του αριθμού των επεμβάσεων. Θα έλεγε κάποιος ότι είναι ενώσεις που πλεονεκτούν σε σχέση με κάποιες άλλες. Ωστόσο παρουσιάζουν μεγάλο κίνδυνο για τα ψάρια και τα πτηνά, ιδίως τις μέλισσες. Ο βιοχημικός μηχανισμός δράσης των πυρεθρινών είναι παρόμοιος με αυτό των οργανοχλωριωμένων, παρεμποδίζουν τη μετάδοση νευρικών σημάτων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα *Permethrin*, *Deltamethrin* και *Cypermethrin* καθώς και τα ισομερή τους.

Ένα επικίνδυνο φυτοφάρμακο που έχει απαγορευτεί εδώ και πέντε χρόνια σε όλο τον κόσμο, η Ελλάδα επιμένει να το χρησιμοποιεί. Με κατ' εξαίρεση άδεια κυκλοφορίας το *Lebaycid* (δραστική ουσία *fenthion*), εναντίον του δάκου της ελιάς, απειλεί όχι μόνο την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, αλλά και τις ελληνικές εξαγωγές ελαιολάδου. Παρότι το συγκεκριμένο φυτοφάρμακο είχε απαγορευτεί στην Ε.Ε. από το 2004, το υπουργείο

Αγροτικής Ανάπτυξης είχε ζητήσει να εξαιρεθεί η Ελλάδα της απαγόρευσης έως το τέλος του 2007. Στις ΗΠΑ δεν έχει έγκριση κυκλοφορίας εξαιτίας του μεγάλου αριθμού θανάτων από δηλητηρίαση. Η Ε.Ε. το απαγόρευσε λόγω της τοξικότητάς του σε υδρόβιους οργανισμούς, μέλισσες και πουλιά. Βιοσυσσωρεύεται στα περιβαλλοντικά συστήματα και στον λιπώδη ιστό των θηλαστικών, όπως και το DDT (www.kathimerini.gr/articles).

2.5. Φυτοπροστατευτικές Ουσίες που εμφανίζονται στα εδώδιμα έλαια

Για τις ουσίες που εμφανίζονται στα εδώδιμα έλαια έχουν γίνει αρκετές μελέτες για την υπολειμματικότητα τους. Οι περισσότερες από αυτές αναφέρονται στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα όπως είναι το fenthion, dimethoate λόγω της ευρείας χρήσης τους στις ελαιοκαλλιέργειες και περιλαμβάνουν προσδιορισμό υπολειμμάτων στον ελαιόκαρπο, ελαιόλαδο και φύλλα ελιάς. Βέβαια, όλες αυτές οι έρευνες έχουν ως απώτερο στόχο τη διασφάλιση της υγείας του καταναλωτή και τη παροχή ενός ασφαλούς προϊόντος στην αγορά.

Μία έρευνα που πραγματοποίησε το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο τα έτη 1989 έως 1990 σε δείγματα ελληνικού παρθένου ελαιολάδου που προερχόταν από παραγωγούς, ελαιοτριβεία και από ελαιώνες που είχαν υποστεί την παρέμβαση της Δακοκτονίας, έδειξε ότι τα δύο πρώτα χρόνια, σε ποσοστά 50% και 21%, σε κανένα από τα δείγματα δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα fenthion και Dimethoate αντίστοιχα ενώ 4% με 6% των δειγμάτων είχαν υπολείμματα που υπερέβαιναν το Ανώτατο Όριο Υπολειμμάτων του Codex Alimentarius (1mg/kg). Η μέση συγκέντρωση βρέθηκε 0,236mg/kg ελαιολάδου και η εκτιμώμενη ημερήσια δόση fenthion 0,0002mg/kg βάρος σώματος (ADI 0,001mg/kg). Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι οι λιπαρές ουσίες του λαδιού ήταν το πιο σημαντικό υπόλειμμα σε φρέσκα δείγματα, ενώ στα παλαιωμένα βρέθηκε μεταβολίτης σουλφοξειδίου της ουσίας fenthion(Lentza-Rizos, 1990).

Μία άλλη έρευνα, το 2004, πραγματοποιήθηκε για τον υπολογισμό υπολειμμάτων έντεκα εντομοκτόνων πυρεθροειδών και οργανοφωσφορικών (Endosulfan) σε φύλλα ελιάς. Οι δραστικές ουσίες αναλύθηκαν σε αέρια χρωματογραφία με NPD και ECD ανιχνευτή. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα οργανοφωσφορικά ήταν 80,7 έως 93,3% ανάκτηση με σχετική απόκλιση RSD< 7,2%. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση 26 δειγμάτων

φύλλων ελιάς από βιολογικούς ελαιώνες σε όλη την Ελλάδα και τα αποτελέσματα επικύρωσαν τη μέθοδο για τη συγκεκριμένη ανάλυση. Επιπλέον υπολείμματα από fenthion και sulfoxide fenthion βρέθηκαν σε τρία δείγματα, αντίστοιχα και η ταυτοποίηση τους έγινε με GC-MS (Μηλιάδης et al., 2004).

Παρακάτω παρουσιάζονται όλες οι δραστικές ουσίες φυτοπροστατευτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες ελιάς, καλαμποκιού και ηλίανθου.

Πίνακας 6. Κατάλογος δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες ελιάς, καλαμποκιού και ηλίανθου

ENTOMOKTONA	MYKHTOKTONA	ZIZANIOKTONA
Alpha-cypermethrin Bacillus thuringiensis var. aizawai Bacillus thuringiensis var. kurstaki Beauveria bassiana Beta-cyfluthrin Chlorpyrifos-methyl Hydrolysed proteins Dimethoate Fenoxycarb paraffin oil Pirimicarb Pyrethrins Pyriproxyfen Spinosad Teflubenzuron Urea Lambda cyhalothrin Cypermethrin Deltamethrin Endosulfan Dioxathion Diphenylamine Diquat Disulfoton Dithianon	Calcium copper sulfate Copper hydroxid Copper oxide Copper oxychloride Copper sulfate, tri-basic Mancozeb Dodine Dithiocarbamates (dithiocarbamates maneb, mancozeb, metiram, propineb, thiram and ziram)	Oxyfluorfen Flumioxazine Glufosinate-ammonium Glyphosate Ethalfluralin

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3- ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα τρόφιμα γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη τα τελευταία τριάντα χρόνια. Η καλύτερη γνώση της τοξικότητας των διαφόρων ουσιών και οι πιέσεις των καταναλωτών και άλλων οικολογικών οργανώσεων προς τις κυβερνήσεις των ανεπτυγμένων χωρών και τους αρμόδιους φορείς ελέγχου, είχαν ως αποτέλεσμα την υποστήριξη της έρευνας με στόχο την ανάπτυξη των αναλυτικών δυνατοτήτων και τη μείωση των ορίων προσδιορισμού των παρασιτοκτόνων σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από ότι παλιά.

3.1. Στάδια Προσδιορισμού Υπολειμμάτων Φ.Π.

- Δειγματοληψία
- Επεξεργασία και αποθήκευση
- Προετοιμασία αναλυτικού δείγματος
- Επιλογή αναλυτικής μεθόδου
- Εφαρμογή αναλυτικής μεθόδου
- Διασφάλιση ποιότητας των αναλυτικών μετρήσεων

3.1.1. Δειγματοληψία

Η παραγωγή ενός προϊόντος ελέγχεται δειγματοληπτικά είτε είναι φρούτα, λαχανικά, χυμοί, κρασιά, λάδι και φυτά μεγάλης καλλιέργειας. Η δειγματοληψία θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική της συνολικής παραγωγής. Για το λόγο αυτό είναι τυχαία, ώστε να δίνεται η ευκαιρία σε όλα τα προϊόντα να αποτελέσουν μέλη του δείγματος εφόσον η εκλογή γίνει αντικειμενικά, χωρίς προκατάληψη και με αμεροληψία.

Γι αυτό θα πρέπει να τηρούνται κάποιοι κανόνες κατά τη λήψη των δειγμάτων, όπως η επιλογή υγιών φυτών ή προϊόντων σε τελικό στάδιο ανάπτυξης, συγκομιδής, η αποφυγή απομάκρυνσης επιφανειακών υπολειμμάτων των Φ.Π. κατά τη λήψη ή συσκευασία των

δειγμάτων, η λήψη επαρκούς ποσότητας για όλες τις πιθανές επαναλήψεις των αναλύσεων στο εργαστήριο και η αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων κατά τη λήψη και μεταφορά (Μηλιάδης, 2004)

3.1.2. Επεξεργασία και αποθήκευση

Το δείγμα μετά τη μεταφορά στο εργαστήριο ομογενοποιείται και στη συνέχεια τοποθετείται στο ψυγείο στους $-18/22^{\circ}\text{C}$ μέσα σε σακουλάκια, όπου η αποικοδόμηση των φυτοπροστατευτικών ουσιών γίνεται με πολύ χαμηλή ταχύτητα. Βέβαια τα δείγματα μπορούν να πάνε κατευθείαν για ανάλυση, οπότε δεν θα χρειαστούν ψύξη.

3.1.3. Επιλογή αναλυτικής μεθόδου

Ο έλεγχος των αγροτικών προϊόντων για την ύπαρξη υπολειμμάτων Φ.Π. απαιτεί την ύπαρξη κατάλληλων εργαστηρίων εξειδικευμένων στην χημική ανάλυση ανίχνευσης και προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στα τρόφιμα, την ύπαρξη εξειδικευμένου επιστημονικού και τεχνικού προσωπικού και τέλος την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων. Για αυτή την επιλογή λαμβάνονται υπόψη τα παρακάτω:

- ❖ Η διεθνής βιβλιογραφία, δηλαδή οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί στο συγκεκριμένο αντικείμενο
- ❖ Η δυνατότητα που παρέχει η μέθοδος για ταυτόχρονο προσδιορισμό περισσότερων της μιας ουσιών
- ❖ Η ικανότητα της μεθόδου για προσδιορισμό ουσιών σε συγκεντρώσεις αρκετά μικρότερες από το ανώτατο επιτρεπτό όριο (MRL).
- ❖ Η ικανότητα προσαρμογής της μεθόδου σε ένα μέσο εργαστήριο ανάλυσης υπολειμμάτων εφοδιασμένο με όργανα ρουτίνας.
- ❖ Ο σκοπός της ανάλυσης, αν η ανάλυση γίνεται για έλεγχο, έρευνα, επιβολή κυρώσεων καθώς και οι απαιτήσεις για ταχύτητα και ακρίβεια.

Για να χρησιμοποιηθεί μία αναλυτική μέθοδος από το εργαστήριο υπολειμμάτων πρέπει πρώτα να ελεγχθεί για μια σειρά από παράγοντες που καθορίζουν την αξιοπιστία της και οι οποίοι είναι: η ορθότητα (accuracy), η ακρίβεια (precision), το όριο ανίχνευσης (LOD, limit of detection), το όριο προσδιορισμού (LOQ, limit of quantification), η ευαισθησία (sensitivity), η εκλεκτικότητα (selectivity), η ειδικότητα (specificity), αλλά και η ανθεκτικότητα (robustness).

3.1.4. Αναλυτική μεθοδολογία

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων διακρίνονται σε πολυδύναμες ή πολύ-υπολειμματικές (multi-residue methods) και εξειδικευμένες ή μόνο-υπολειμματικές (specific methods). Οι πολυδύναμες ή πολύ-υπολειμματικές αναπτύχθηκαν για να διεκπεραιώσουν τον έλεγχο ρουτίνας (monitoring) των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και να επιτρέπουν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών μορίων Φ.Π. (ως και 200). Με τις μεθόδους αυτές προσδιορίζονταν πιο πολύ από οργανοφωσφορικά, Οργανοχλωριωμένα αλλά και άλλων ομάδων φ.π. ανάλογα των χρησιμοποιημένων χρωματογραφικών ανιχνευτών, ενώ σήμερα έχουν πολύ μεγάλη ευρύτητα ως προς τη χημική κατηγορία των μορίων που προσδιορίζουν. Βέβαια, τις πιο πολλές φορές χρειάζεται η εφαρμογή δύο ή περισσότερων πολυδύναμων μεθόδων ιδιαίτερα για μόρια που η ανάλυση τους απαιτεί ξεχωριστές χρωματογραφικές τεχνικές (αέρια ή υγρή χρωματογραφία). Για τις ουσίες που δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με κάποια πολυδύναμη μέθοδο, απαιτείται η χρήση εξειδικευμένων ή μονό-υπολειμματικών μεθόδων που είναι τόσες όσες και τα φάρμακα που προσδιορίζουν. Τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη της συζευγμένης χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (GC-MS, LC-MS) έχουν αυξηθεί εντυπωσιακά οι δυνατότητες των πολυδύναμων μεθόδων τόσο στον αριθμό των μορίων όσο και στην ταυτοποίηση τους ώστε να αναφέρονται στη βιβλιογραφία μέθοδοι για 500 μόρια παρασιτοκτόνων (Alder *et al*, 2006).

3.2.Φάσεις προσδιορισμού υπολειμμάτων

3.2.1. Προετοιμασία των δειγμάτων

Σε οδηγία της Ε.Ε. ορίζεται το τμήμα του αγροτικού προϊόντος στο οποίο αναφέρονται τα MRLs και επομένως το μέρος στο οποίο πρέπει να γίνει η ανάλυση. Στις πιο πολλές περιπτώσεις αυτά τα όρια αναφέρονται σε ολόκληρα τα προϊόντα, όπως αυτά κυκλοφορούν στο εμπόριο. Το δείγμα που φτάνει στο εργαστήριο πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό του αρχικού φορτίου, υφίσταται μείωση και ομογενοποιείται με εργαστηριακούς ομογενοποιητές. Από αυτό το δείγμα λαμβάνεται υπόψη μια μικρή ποσότητα που πηγαίνει για ανάλυση και μία ανάλογου βάρους ποσότητα αποθηκεύεται στο καταψύκτη ως αντιδείγμα (Μηλιάδης, 1998).

3.2.2. Εκχύλιση

Είναι το στάδιο κατά το οποίο τα Φ.Π. λαμβάνονται από τους φυτικούς ιστούς με κατάλληλα εκχυλιστικά διαλύματα. Η επιλογή των εκχυλιστικών μέσων είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της ανάλυσης. Θα πρέπει το εκχυλιστικό μέσο που θα χρησιμοποιηθεί να διαθέτει μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα προκειμένου να βγάλει τα μόρια από τα Φ.Π. από τους ιστούς, παράλληλα όμως να είναι αρκετά εκλεκτικά για να αποφεύγεται η εκχύλιση ανεπιθύμητων ουσιών από το υπό μελέτη υπόστρωμα ώστε το εκχύλισμα να είναι όσο το δυνατόν πιο καθαρό. Οι περισσότερες φυτικές ουσίες είναι πολικές με εξαίρεση τα έλαια. Ο κατάλληλος διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί είναι εκείνος που θα έχει συγγενείς ιδιότητες και κυρίως παρόμοια πολικότητα με το υπό μελέτη φυτοφάρμακο. Όμοιο διαλύει όμοιο.

Άμεση σημασία έχει η επιλογή του κατάλληλου εκχυλιστικού μέσου στις πολυπολειμματικές μεθόδους. Από τα Φ.Π. που έχουν χρησιμοποιηθεί στη παραγωγική διαδικασία ή μετασυλλεκτικά ή περιέχονται στο δείγμα σαν συνέπεια προγενέστερων χρήσεων και ρύπανσης του περιβάλλοντος, άλλα είναι πολικά άλλα μη πολικά και τέλος άλλα είναι μέσης πολικότητας. Άρα το εκχυλιστικό μέσο πρέπει να έχει την κατάλληλη

σύνθεση ώστε να μπορεί να εκχυλίσει ουσίες με διαφορετική πολικότητα. Προκειμένου να πετύχουμε ικανοποιητική εκχύλιση χρησιμοποιούμε ομογενοποιητή μεγάλων ταχυτήτων και οι βασικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως η ακετόνη, ο οξικός αιθυλεστέρας, το διχλωρομεθάνιο, η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο.

3.2.3. Διήθηση

Το προϊόν της εκχύλισης αποτελείται από τους φυτικούς ιστούς τεμαχισμένους σε πολύ μικρά σωματίδια (στερεή φάση) και την υγρή φάση. Για το λόγο αυτό διηθείται ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά σωματίδια. Η διήθηση γίνεται είτε με φυσική ροή πάνω από το τεμάχιο υάλου χαλαζία ή υαλοβάμβακα ειδικής καθαρότητας, είτε υπό κενό σε χωνιά Buchner εφοδιασμένα με χάρτινο ηθμό. Συχνά σε αυτή τη φάση χρησιμοποιείται και η φυγοκέντρηση του δείγματος για το διαχωρισμό των στερεών από την υγρή φάση.

3.2.4. Καθαρισμός Εκχυλίσματος (clean up)

Το εκχύλισμα που λαμβάνεται από τη φάση της εκχύλισης είναι μίγμα των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση και του νερού που υπήρχε μέσα στους φυτικούς ιστούς των αγροτικών προϊόντων. Για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων των Φ.Π. θα πρέπει να απαλλαγούμε από όσο το δυνατόν μεγαλύτερο αριθμό ανεπιθύμητων ουσιών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι καθαρισμού του εκχυλίσματος ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του Φ.Π. και των εκχυλισμάτων (Μηλιάδης, 1998).

3.2.5. Συμπύκνωση του Εκχυλίσματος

Ο τελικός όγκος που παραλαμβάνεται από το προηγούμενο στάδιο θα πρέπει να μειωθεί σε 1-10 mL προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση του υπολείμματος. Αυτό επιτυγχάνεται με συμπύκνωση σε περιστροφικό εξατμιστήρα, όπου η εξάτμιση γίνεται υπό κενό σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, περίπου 30-40°C, για να μη διασπώνται οι θερμοευαίσθητες ουσίες. Επίσης, κάποιοι μικροί όγκοι πτητικών διαλυτών μπορούν να εξατμιστούν με ρεύμα καθαρού αζώτου. Μετά τη συμπύκνωση ακολουθεί αλλαγή διαλύτη για λόγους καλής χρωματογραφικής ανάλυσης. Στην περίπτωση αυτή η συμπύκνωση γίνεται μέχρι ξηρού και έπειτα προστίθεται ο νέος διαλύτης. Οι όγκοι πρέπει να μετρώνται με μεγάλη ακρίβεια γιατί επηρεάζουν σημαντικά και άμεσα τον τελικό προσδιορισμό.

3.3. Τεχνικές Εκχύλισης

3.3.1. Εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE, liquid-liquid extraction)

Σε αυτή τη μέθοδο έχουμε κατανομή δύο υγρών φάσεων, προκύπτει διαχωρισμός χημικών ουσιών με βάση τη διαφορετική διαλυτότητα τους σε ένα σύστημα δύο μη αναμιγνυόμενων διαλυτών. Χρησιμοποιείται για την εκχύλιση υγρών δειγμάτων (νερό, κρασί, ...) ή για τον καθαρισμό υγρών εκχυλισμάτων.

3.3.2. Εκχύλιση στερεού/υγρού (Solid/Liquid Extraction - SLE)

Η εκχύλιση αυτού του τύπου περιλαμβάνει την εκχύλιση του ομογενοποιημένου στερεού δείγματος με τον οργανικό διαλύτη και όπως η LLE διακρίνεται και αυτή σε συνεχή και ασυνεχή. Στην περίπτωση της συνεχούς εκχύλισης το δείγμα εκχυλίζεται με τη συσκευή *Soxhlet*, όπου το προς εκχύλιση δείγμα (5,0 - 50 g) τοποθετείται στον εκχυλιστήρα της συσκευής και εκχυλίζεται με οργανικό διαλύτη (100 - 200mL) για 4 έως 18 ώρες. Στην ασυνεχή εκχύλιση το εξεταζόμενο δείγμα εκχυλίζεται διαδοχικά έως την ποσοτική λήψη

των Φ.Ο. Παρά το ότι είναι μια χρονοβόρα διαδικασία εκχύλισης, βρίσκει ευρεία εφαρμογή διότι επιτυγχάνονται υψηλές ανακτήσεις (Pensado et al., 2005).

Σήμερα η χρήση της συσκευής *Soxhlet* δεν προτιμάται καθώς χρησιμοποιούνται πολύ μεγάλοι όγκοι διαλυτών με το ανάλογο περιβαλλοντικό αλλά και οικονομικό κόστος. Μια συνήθης διαδικασία για την επίτευξη της εκχύλισης στερεού υγρού είναι η ανακίνηση για ορισμένο χρονικό διάστημα, αλλά και η χρήση λουτρού υπερήχων.

3.3.3. Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction-MAE)

Σε αυτή τη μέθοδο εκχύλισης το προς ανάλυση δείγμα αναμιγνύεται με τον οργανικό διαλύτη και ακτινοβολείται σε συμβατικό φούρνο μικροκυμάτων, χωρίς όμως το αιώρημα να φτάσει στο σημείο βρασμού του. Η ακτινοβολήση συνήθως γίνεται για 30sec και επαναλαμβάνεται μερικές φορές για να επιτευχθούν οι μέγιστες ανακτήσεις της εκχυλιζόμενης ουσίας. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ο μικρός χρόνος εκχύλισης με αποδόσεις ανάλογες των κλασικών μεθόδων εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες (Camel, 2000). Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων από οργανοφωσφορικά φυτοπροστατευτικά σε ελαιόλαδο (Fuentes et al. 2008). Επίσης εξέλιξη της τεχνικής αυτής είναι η εκχύλιση με μικροκύματα σε ατμοσφαιρική πίεση (Microwave Assisted Extraction at atmospheric pressure- APMAE (Fuentes et al., 2009).

3.3.4 Επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (Accelerated Solvent Extraction- ASE)

Η επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη ή εκχύλιση με διαλύτη υπό πίεση (*Pressurized Solvent Extraction - PSE*) εφαρμόζεται από το 1995. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι οι συνθήκες υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας που επικρατούν κατά την εκχύλιση. Οι υψηλές πιέσεις εξασφαλίζουν την αποτελεσματική διείσδυση του διαλύτη στους πόρους του δείγματος, ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν το ρυθμό

διάχυσης, τη μεταφορά μάζας και τη διαλυτότητα των υπό εξέταση ενώσεων και μειώνουν το ιξώδες και την επιφανειακή τάση των διαλυτών, μειώνοντας έτσι κατά πολύ τους όγκους εκχύλισης των διαλυτών (Ahmed, 2001).

3.3.5. Εκχύλιση υπερκρίσιμου σημείου (Supercritical Fluid Extraction - SFE)

Μια διαχρονική τεχνική η οποία συγκεντρώνει το ενδιαφέρον των αναλυτών υπολειμμάτων, λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας που παρουσιάζει και της χρήσης πολύ μικρών όγκων διαλυτών. Στην εκχύλιση αυτού του τύπου χρησιμοποιούνται ρευστά σε υπερκρίσιμη κατάσταση, συνήθως διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας (31°C) και πίεσης (72,8 Atm) κρίσιμου σημείου, τα οποία παρουσιάζουν παρόμοια πυκνότητα με τους υγρούς διαλύτες, αλλά έχουν χαμηλότερο ιξώδες και υψηλότερους συντελεστές διάχυσης. Ο συνδυασμός των προαναφερθέντων ιδιοτήτων οδηγούν στην αποτελεσματικότερη και ταχύτερη εκχύλιση των αναλυτών σε σχέση με την εκχύλιση που γίνεται με τους υγρούς διαλύτες. Σε σύγκριση με την εκχύλιση σε στερεά προσροφητικά υλικά έχει το πλεονέκτημα του ενός βήματος στην πειραματική πορεία εκχύλισης. Τα εκχυλίσματα τα οποία λαμβάνονται είναι σχετικά καθαρά και το πλεονέκτημα του μικρού εκχυλιστικού όγκου μπορεί να θεωρηθεί και μειονέκτημα στην περίπτωση που απαιτείται να αναλυθούν μεγαλύτερες ποσότητες δείγματος (Camel, 1998).

3.3.6. Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE, solid phase extraction)

Πρόκειται για εκχύλιση μεταξύ μιας στερεάς φάσης και μιας υγρής φάσης που είναι το δείγμα (συνήθως νερό, κρασί, οργανικό εκχύλισμα). Πραγματοποιείται ενεργοποίηση της στερεάς φάσης που είναι συσκευασμένη σε πλαστικά γυάλινα φυσίγγια, με κατάλληλο διαλύτη, προσθήκη της υγρής φάσης, καθαρισμός της υγρής φάσης από παρεμποδίζουσες ή ανεπιθύμητες ουσίες με χρήση κατάλληλου/ων διαλυτών και τέλος η έκλουση της δραστικής ουσίας με διέλευση κατάλληλου διαλύτη από το φυσίγγιο. Το χρωματογραφικό της σύστημα αποτελείται από μια στατική φάση (προσροφητικό), η οποία είναι ένα στερεό

υλικό επιφανειακά ενεργό, και μια κινητή φάση (διαλύτης έκλουσης), που αποτελείται από οργανικό διαλύτη ή μίγμα αυτών. Ο διαχωρισμός των ενώσεων στηρίζεται στη διαφορετική ικανότητα κατακράτησης των ουσιών πάνω στην επιφάνεια της στερεάς φάσης (του προσροφητικού). Τα υλικά που χρησιμοποιούνται στη SPE είναι είτε μικροστήλες, οι οποίες περιέχουν κατάλληλο χρωματογραφικό υλικό (*C-18*, *Diol*, *Silica*, *Florisil*), είτε δίσκοι εκχύλισης στους οποίους το χρωματογραφικό υλικό είναι με μορφή μεμβράνης ενσωματωμένης πάνω σε ένα δίσκο με δίκτυο μικροϊνιδίων (*PTFE*).

Η κατακράτηση των ενώσεων επιτυγχάνεται με ισχυρές, ωστόσο αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι οι *υδρόφοβες* (μη πολικές αλληλεπιδράσεις με δυνάμεις διασποράς), οι οποίες λαμβάνουν χώρα στα συστήματα SPE αντίστροφης φάσης (με χρωματογραφικό υλικό συνήθως *C-18*), οι *υδρόφιλες* (πολικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις δίπολου-δίπολου), που συνήθως παρατηρούνται στα συστήματα SPE κανονικής φάσης (με χρωματογραφικά υλικά αλουμινίου, *silica*, *florisil*) και τέλος οι αλληλεπιδράσεις *ηλεκτροστατικής φύσεως* μεταξύ φορτισμένων ομάδων της ένωσης και της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού, οι οποίες εντοπίζονται στα συστήματα SPE ιοντοανταλλαγής.

3.3.7. Χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής ή χρωματογραφία μοριακού διαχωρισμού (GPC)

Εφαρμόζεται για το διαχωρισμό Φ.Π. από λιπώδη και ελαιώδη υποστρώματα . Χρησιμοποιείται μία στήλη πληρωμένη με κατάλληλου μεγέθους πόρους ρητίνης, συνήθως πηκτής πολυστυρενίου. Ενώσεις, όπως λίπη και χλωροφύλλη εκλούνται πρώτες και απομακρύνονται, ενώ τα Φ.Π. εκλούνται αργότερα. Μετά γίνεται δεκτό το κλάσμα των Φ.Π. για το διαχωρισμό των οποίων εφαρμόζεται άλλου είδους χρωματογραφία.

3.4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός

Μέχρι το 1960 χρησιμοποιήθηκαν κυρίως βιολογικές μέθοδοι ή μέθοδοι κλασικής χημείας, όπως η χρωματομετρία, η χρωματογραφία σε χαρτί, η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, κλπ. Από το 1970 και μετά η μεθοδολογία προσδιορισμού υπολειμμάτων Φ.Π.

γνώρισε τεράστια ανάπτυξη και βασίστηκε κυρίως στη χρήση εξειδικευμένων οργάνων ανάλυσης (ενόργανη ανάλυση). Τα όργανα αυτά είναι κυρίως ο αέριος χρωματογράφος, ο υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (HPLC) με τους κατάλληλους ανιχνευτές και τα συζευγμένα συστήματα αέριας ή υγρής χρωματογραφίας με φασματογραφία μάζας. Για ορισμένες εξειδικευμένες μεθόδους χρησιμοποιείται ακόμη το φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους. Δε θα πρέπει να παραλείψουμε και τις βιοτεχνολογικές μεθόδους που τα τελευταία χρόνια γνωρίζουν μεγάλη ανάπτυξη.

3.5.Ενόργανες Τεχνικές προσδιορισμού υπολειμμάτων

3.5.1. Αέρια Χρωματογραφία

Αυτή η τεχνική (Gas chromatography, GC) αναπτύχθηκε από τους Martin και James το 1952. Με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας, μικρή ποσότητα (1-2μL) από το τελικό εκχύλισμα εγχύεται στη κορυφή θερμαινόμενης ειδικής στήλης χρωματογραφίας τοποθετημένης σε κλίβανο ώστε το εκχύλισμα να μεταπέσει σε αέρια φάση. Ένα αδρανές αέριο κινείται μέσα στη στήλη και παρασύρει τους ατμούς του δείγματος. Ο χρόνος παραμονής κάθε ουσίας στη στήλη(χρόνος κατακράτησης, retention time), είναι συνάρτηση των ιδιοτήτων της και είναι ένα από τα κριτήρια για το ποιοτικό προσδιορισμό. Το μέγεθος του σήματος που καταγράφεται από κατάλληλα όργανα στην έξοδο της στήλης, είναι το κριτήριο για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται κυρίως για Φ.Π. που έχουν ικανοποιητική πτητικότητα και θερμική σταθερότητα. Ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας αποτελείται από τις φιάλες παροχής αερίων, τον εγχυτή, το φούρνο με τη χρωματογραφική στήλη, τον ανιχνευτή και το καταγραφικό σύστημα. Ο εγχυτής είναι το εξάρτημα μέσα στο οποίο γίνεται η έγχυση του δείγματος. Οι εγχυτές στα όργανα μπορεί να είναι δύο τύπων, split-splitless ή on-column. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι τριχοειδείς και η πολικότητα τους είναι καθοριστική για το διαχωρισμό και την ανάλυση. Η χρησιμοποίηση στηλών διαφορετικής πολικότητας προτείνεται ως η πιο απλή, αν και μειωμένης αξιοπιστίας, μέθοδος ταυτοποίησης και επιβεβαίωσης των χρωματογραφικών ευρημάτων.

Ο ανιχνευτής είναι το εξάρτημα που ανιχνεύει τις ουσίες στην έξοδο της στήλης. Οι ανιχνευτές είναι είτε εξειδικευμένοι για ορισμένα άτομα των μορίων ή μη εξειδικευμένοι. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές στην αέρια χρωματογραφία για αναλύσεις υπολειμμάτων, είναι:

- Ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (NPD) που είναι εξειδικευμένος για ουσίες που περιέχουν άζωτο ή φώσφορο στο μόριο τους, π.χ. οργανοφωσφορικά, τριαζίνες.
- Ανιχνευτής δέσμησης ηλεκτρονίων (ECD) για οργανοαλογονούχες ενώσεις.
- Ανιχνευτής φωτομετρίας φλόγας (FPD) που με το κατάλληλο φίλτρο προσδιορίζει ουσίες που στο μόριο τους περιέχεται θείο ή φώσφορος π.χ. οργανοφωσφορικά.
- Φασματογράφος μάζας

Το καταγραφικό καταγράφει υπό μορφή κορυφής το σήμα. Στα σύγχρονα όργανα όλες οι παράμετροι ρυθμίζονται με το κατάλληλο πρόγραμμα ενός συστήματος ηλεκτρονικού υπολογιστή, μέσω του οποίου επίσης γίνεται η καταγραφή και η επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος.

3.5.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για προσδιορισμό υπολειμμάτων Φ.Π. που δεν μπορούν να προσδιοριστούν με αέρια χρωματογραφία, είτε λόγω θερμικής αστάθειας, είτε λόγω χαμηλής πτητικότητας, είτε λόγω μεγάλης πολικότητας, όπως τα βενζιμιδαζολικά μυκητοκτόνα, N-μεθυλοκαρβαμιδικά εντομοκτόνα, νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα, βενζουλουρίες και αρκετά ζιζανιοκτόνα όπως φαινυλοξικά οξέα, φαινολικά παράγωγα της ουρίας και οι σουλφονυλουρίες. Το κύριο προσόν της είναι η λειτουργία της σε χαμηλές θερμοκρασίες και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών ευπαθών στις υψηλές θερμοκρασίες της αέριας χρωματογραφίας όπως βιολογικά μόρια καθώς και ουσίες που δε μπορούν να αεριοποιηθούν. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ότι η υγρή χρωματογραφία πλεονεκτεί σε σχέση με την αέρια στον προσδιορισμό πολικών, μη πτητικών και θερμοευαίσθητων ενώσεων. Μειονεκτεί στη διακριτική ικανότητα και

συνεπώς σε εξειδίκευση. Η HPLC αποτελείται από τις φιάλες αποθήκευσης των διαλυτών (κινητή φάση), το σύστημα απαέρωσης της κινητής φάσης, το σύστημα αντλιών, τον εγχυτή, τη χρωματογραφική στήλη, τη μονάδα θερμοστάτησης της στήλης, τον ανιχνευτή και τέλος το καταγραφικό με τη μονάδα επεξεργασίας του χρωματογραφικού σήματος. Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας έχει αρκετά κοινά σημεία με την αέρια όμως διαφέρει ως προς το ότι η ουσία παραμένει στην ίδια φυσική κατάσταση που είχε τόσο κατά την έγχυση όσο και κατά το διαχωρισμό της στη στήλη και δεν αεριοποιείται. Επίσης η κινητή φάση είναι υγρή (διαλύτης ή μίγμα διαλυτών ή μίγμα διαλυτών και ρυθμιστικών διαλυμάτων) σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία όπου είναι αέρια. Στην υγρή χρωματογραφία υπάρχουν πέντε διαφορετικοί μηχανισμοί διαχωρισμού: η χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption), η χρωματογραφία κατανομής (partition), χρωματογραφία προσδεμένης φάσης (bonded phase), χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (ion exchange) και η χρωματογραφία αποκλεισμού (exclusion). Επειδή δεν είναι πάντα σαφής η διάκριση μεταξύ κατανομής και προσρόφησης διακρίνουμε δύο είδη υγρής χρωματογραφίας ανάλογα με τις σχετικές πολικότητες μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης:

- ♦ Χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase chromatography): η στατική φάση είναι πιο πολική από την κινητή, με αποτέλεσμα οι λιγότερο πολικές ενώσεις να εκλύονται πρώτες και η έκλυση μιας ένωσης να γίνεται ευκολότερα με σχετική αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης.

- ♦ Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reverse phase chromatography): η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή, με αποτέλεσμα οι πιο πολικές ενώσεις να εκλύονται πρώτες και η έκλυση μιας ένωσης να γίνεται ευκολότερα με σχετική μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης.

Οι πιο χρησιμοποιημένοι ανιχνευτές στην υγρή χρωματογραφία για αναλύσεις υπολειμμάτων είναι: ανιχνευτές απορρόφησης (UV-VIS), Φθορισμού (Fluorescent- FLD), Diode Array Detector (UV-DAD), ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές, ανιχνευτές δείκτης διάθλασης και ανιχνευτές φασματομετρίας (LC-MS) (Δεληγιαννάκης, et al, 2010).

3.6. Εκτίμηση των αποτελεσμάτων και αξιολόγηση των μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων

Σε κάθε στάδιο της αναλυτικής μεθόδου υπάρχει ο κίνδυνος για πιθανό σφάλμα. Τα σφάλματα συχνά προέρχονται από παράγοντες όπως η άγνοια, λάθη, κακή επιστημονική κρίση. Για την αποφυγή τέτοιων σφαλμάτων, παράλληλα με την ανάλυση του κυρίως δείγματος αναλύονται και:

- ο Το τυφλό δείγμα αντιδραστηρίων (reagent blanc), που περιέχει μόνο τους διαλύτες και τα αντιδραστήρια.
- ο Τα δείγματα του μάρτυρα (control sample), δηλαδή δείγμα χωρίς ίχνος από το Φ.Π. που εξετάζεται.
- ο Τα φορτισμένα δείγματα (spiked samples) που είναι δείγματα <<μάρτυρα>> τεχνητά φορτισμένα με τη δραστική ουσία που εξετάζουμε (Council Directive 94/43 EC).

Οποιαδήποτε μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων ακόμα και αν χρησιμοποιείται ευρέως πρέπει να αξιολογείται και να ελέγχεται από τον αναλυτή ή το εργαστήριο που πρόκειται να την χρησιμοποιήσει για πρώτη φορά. Αυτός ο έλεγχος γίνεται μελετώντας τα παρακάτω στοιχεία:

Ορθότητα, Ακρίβεια, Γραμμικότητα του ανιχνευτή, Όριο ανίχνευσης (LOD), Όριο προσδιορισμού (LOQ).

3.7. Η σημαντικότητα της εκχύλισης και η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου

Η ανάλυση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε τρόφιμα συνήθως εμποδίζεται από διάφορα συστατικά που περιέχονται στο τρόφιμο και εμποδίζουν στη δημιουργία καλής ανάκτησης. Ο στόχος είναι η επιλογή μιας μεθόδου που θα δώσει καλή ανάκτηση και θα μειώσει την εμφάνιση παρεμβάσεων με τη σωστή εκχύλιση και τη διαδικασία καθαρισμού. Αυτό που παίζει σημαντικό ρόλο στην επιλογή είναι αν το υπόστρωμα είναι υγρό (χυμοί, κρασί, νερό, λάδι) ή στερεό (φρούτα, λαχανικά). Εκεί

υπολογίζονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των μεθόδων. Η ανάλυση των υγρών δειγμάτων πλεονεκτεί σε σχέση με τα στερεά δείγματα στο γεγονός ότι απαιτείται ένα στάδιο λιγότερο στην όλη διαδικασία μέχρι τη στιγμή της χρωματογραφικής ανάλυσης. Τα στερεά δείγματα πρώτα ομογενοποιούνται με μηχανικό τρόπο πριν πάνε για εκχύλιση, στη συνέχεια αναμειγνύονται ή ανακατεύονται με ένα οργανικό διαλύτη, μετά το δείγμα φυγοκεντρείται, συμπυκνώνεται και μετά ακολουθεί η χρωματογραφική ανάλυση. Ο καθαρισμός του δείγματος γίνεται συνήθως πριν την τελική χρωματογραφική ανάλυση. Ανάμεσα σε πολλούς διαλύτες, αυτοί που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι το ακετονιτρίλιο (ACN), ο οξικός αιθυλεστέρας (EtAc), αλλά και η ακετόνη, το εξάνιο, η μεθανόλη και το διχλωρομεθάνιο. Το ακετονιτρίλιο είναι πολικός διαλύτης με υδροφοβικές δυνατότητες στο να εκχυλίζει πολικά και μη πολικά υπολείμματα εντομοκτόνων από τρόφιμα χαμηλού λίπους. Η καταλληλότητα του συγκεκριμένου διαλύτη έγκειται στο γεγονός ότι δημιουργεί γρήγορα εκχύλισμα τα οποία είναι δυνατόν να οδηγηθούν ακόμη και απευθείας για ανάλυση σε συστήματα LC-MS, MS-MS.. Μάλιστα το ακετονιτρίλιο θεωρείται κατάλληλο για τη χρήση της μεθόδου της QuEChERS, ενώ περίπου 7 μέθοδοι βασίζονται στη χρήση αυτού του διαλύτη για την εκχύλιση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διάφορων ομάδων παρασιτοκτόνων σε φρούτα και λαχανικά. Ακόμη χρησιμοποιούνται για εκχυλίσεις και μέσης πολικότητας διαλύτες, όπως για παράδειγμα ακετόνη και διχλωρομεθάνιο, αν και το τελευταίο θεωρείται επιβλαβές για την ανθρώπινη υγεία και για το περιβάλλον και δεν προτιμάται (Lampropoulou -Albanis,2007).

Κάποιες πολυ-υπολειμματικές μέθοδοι φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται είναι πολύπλοκες και χρονοβόρες και απαιτούν μεγάλες ποσότητες διαλυτών και βέβαια κοστίζουν. Από την άλλη ο χρόνος που καταναλώνεται στο εργαστήριο για την ανάλυση των δραστικών ουσιών- αναλυτών που εμφανίζονται στο προσκήνιο και των νέων τεχνικών ανάλυσης δεν επαρκεί. Για το λόγο αυτό πολλοί βασικοί αναλύτες (δραστικές ουσίες) δε μπορούν να καλυφθούν από τις βασικές μεθόδους προσδιορισμού υπολειμμάτων των εργαστηρίων.

Καθώς η χρήση διαλυτών στην εκχύλιση και ιδιαίτερα η χρήση μεγάλων ποσοτήτων διαλυτών παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν αρκετές αναλυτικές μεθοδολογίες προκειμένου να παρακάμψουμε τα συγκεκριμένα προβλήματα με

στόχο τη μείωση του όγκου των διαλυτών, όπως οι τεχνικές μικροεκχύλισης (microextraction) ή τη μη χρήση των διαλυτών (solventless).

3.8. Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων στα έλαια ανά ομάδα δραστικών ουσιών.

Στην παράγραφο αυτή θα γίνει αναφορά στις αναλυτικές μεθόδους που παρουσιάστηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία τα τελευταία είκοσι χρόνια και έχουν ως αντικείμενο αναλυτικές μεθοδολογίες για την ανάλυση ελαιολάδου για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων. Η παρουσίαση αυτή ομαδοποιείται τεχνικά με τη χρησιμοποίηση του κατάλληλου ανιχνευτή, NPD ή ECD, και κατ'επέκταση αναφέρεται στις δραστικές ουσίες που μπορεί να ανιχνευθούν από αυτούς. Έτσι λοιπόν, θα γίνει παρουσίαση αφενός των μεθόδων που χρησιμοποιούν σύστημα GC-NPD και αναφέρονται στον προσδιορισμό των οργανοφωσφορικών γεωργικών φαρμάκων και αφετέρου των μεθόδων που χρησιμοποιούν σύστημα GC-ECD και αναφέρονται στον προσδιορισμό των πυρεθρινών και οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων.

Οργανοφωσφορικά

- Μέθοδος εκχύλισης LLE (liquid-liquid phase): Αναμειγνύονται 10g λάδι και εξάνιο κορεσμένο με ACN (ακετονιτρίλιο), ανακινούνται σε 1mL H₂O με ακετονιτρίλιο κορεσμένο με εξάνιο. Ακολουθεί καθαρισμός (clean-up) του εκχυλίσματος με κατανομή εξανίου και ακετονιτρίλιου. Η ανάλυση (διαχωρισμός και προσδιορισμός των ουσιών που αναφέρονται σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα) πραγματοποιείται με GC (αέρια χρωματογραφία) με NPD ανιχνευτή (Lentza-Rizos, 1994).
- Μέθοδος εκχύλισης GPC (Gel Permeation Chromatography): Χρησιμοποιείται κατά βάση για την εκχύλιση οξικός αιθυλεστέρας και κυκλοεξάνιο. Δεν απαιτείται να ακολουθήσει καθαρισμός του εκχυλίσματος. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση ελαιολάδου στην αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτές GC-FPD ή GC-NPD. Αναφέρεται στον προσδιορισμό είκοσι φυτοπροστατευτικών ουσιών που ανήκουν

στην ομάδα των οργανοφωσφορικών και τα αποτελέσματα εμφανίζουν υψηλές ανακτήσεις 93-160%, όταν χρησιμοποιείται FPD ανιχνευτής (Vreuls et al., 1996).

- Μέθοδος εκχύλισης LLE (liquid-liquid extraction): Αναμειγνύονται 2g λάδι και 2mL εξάνιο, ανακινούνται και προστίθενται 10mL ACN(ακετονιτρίλιο), ανακίνηση. Παραλαμβάνονται 7,5mL εκχυλίσματος ακετονιτρίλιου. Ξήρανση και τέλος παραλαβή με 1,5 ml εξάνιο. Δεν ακολουθεί καθαρισμός (clean-up) Ανάλυση σε GC (αέρια χρωματογραφία) με NPD ανιχνευτή και ανάκτηση 74-118% (Cabras et al., 1997).
- Μέθοδος εκχύλισης LLE (liquid-liquid extraction), η οποία χρησιμοποιείται και για προσδιορισμό τριαζινών (ζιζανιοκτόνων ουσιών) σε ελαιόλαδο: Αναμειγνύονται 5g λάδι και 25mL ή 10mL ACN (ακετονιτρίλιο) και 10mL ακετόνης. Στο τέλος παραλαμβάνονται 10mL εκχυλίσματος και συμπυκνώνονται σε 2mL ακετόνης. Ακολουθεί καθαρισμός (clean-up) με καθίζηση του λίπους και ανάλυση σε GC (αέρια χρωματογραφία) με NPD ανιχνευτή. Η μέθοδος εμφανίζει όρια ανίχνευσης (LOD) 1,5-6 mg/kg και ανακτήσεις 77-104% (Lentza-Rizos et al., 2001a).
- Μέθοδος εκχύλισης MAE (microwave Assisted Extraction) με ακετονιτρίλιο και διχλωρομεθάνιο. Ακολουθεί καθαρισμός (clean-up) του εκχυλίσματος με SPE (Solid-Phase Extraction) και ανάλυση (διαχωρισμός και προσδιορισμός των ουσιών) σε GC (αέρια χρωματογραφία) με FPD ανιχνευτή ή συζευγμένο σύστημα GC-MS. Αναφέρεται σε οργανοφωσφορικές φυτοπροστατευτικές ουσίες (dimethoate, diazinon, pirimiphos methyl, parathion methyl, malathion, fenthion, chlorpyrifos, methidathion and azinphos methyl) και παρουσιάζει καλά αναλυτικά χαρακτηριστικά με RSD <11% , LOQ 0,07-0,020 µg/g και καλές τιμές ανάκτησης 62-99% (Fuentes et al., 2008).

Πυρεθροειδή

- Μέθοδος εκχύλισης LLE (liquid-liquid extraction), χρησιμοποιείται και για ανάλυση του Οργανοχλωριωμένου Endosulfan και 5 πυρεθροειδών εντομοκτόνων cypermethrin, Deltamethrin, Fenvalerate, λ-cyhalothrin, permethrin, : 5g λάδι εκχυλίζεται με ACN (ακετονιτρίλιο) και ακολουθεί καθαρισμός (clean-up) του εκχυλίσματος με καθίζηση

του λίπους. Το υπερκείμενο υγρό οδηγείται προς ανάλυση σε GC (αέρια χρωματογραφία) με ECD ανιχνευτή. Η μέθοδος εμφανίζει όρια ανίχνευσης (LOD) 0,001-0,2 µg/ml και ανακτήσεις 71-91% και RSD 6-17% (Lentza-Rizos et al., 2001b).

- Μέθοδος εκχύλισης στην οποία χρησιμοποιείται ως διαλύτης το τετραυδροφουράνιο (THF) και ακολουθεί διαχωρισμός των φάσεων. Με αυτή τη μέθοδο μπορούμε να αναλύσουμε επίσης Οργανοχλωριωμένα και οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα. Μπορεί να μην ακολουθήσει clean-up του εκχυλίσματος και να οδηγηθεί προς ανάλυση σε σύστημα GC-MS ή/και LC-MS με ανακτήσεις 60-98% και 40-95% αντίστοιχα (Barrec et al., 2003).
- Μέθοδος εκχύλισης LLE (liquid-liquid extraction): 2g λάδι εκχυλίζεται με ακετόνη και εξάνιο. Ακολουθεί καθαρισμός (clean-up) με GPC και ανάλυση του εκχυλίσματος σε σύστημα GC-MS. Η μέθοδος εμφανίζει όρια ανίχνευσης (LOD) 0,05-1,5 mg/Kg και ανάκτηση 84-110%.

3.9.QuEChERS – Μία νέα μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων

3.9.1. Ιστορική αναδρομή

Η μέθοδος QuEChERS αναπτύχθηκε από τον Μιχαήλ Άγγελο Αναστασιάδη κατά τα έτη 2001 και 2002 κατά τη διάρκεια της επίσκεψής του στις (ΗΠΑ) στην ερευνητική ομάδα του Steven Lehotay. Αρχικά, η μέθοδος αναπτύχθηκε για την ανάλυση κτηνιατρικών φαρμάκων (θυρεοστατικά) στους ιστούς των ζώων, αλλά μετά από μεγάλη επιτυχία της μεθόδου στην εκχύλιση βασικών ενώσεων δοκιμάστηκε και σε ανάλυση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε φυτικό ιστό και σημείωσε και εκεί μεγάλη επιτυχία. Η μέθοδος παρουσιάστηκε πρώτη φορά τον Ιούνιο του 2002 στη Ρώμη (M. Anastassiades, SJ Lehotay, D. Stajnbaher: «Γρήγορα, εύκολα, φθηνά, αποτελεσματικά, τραχύ και ασφαλή (Quick, Easy, Cheep, Effective, Robust, Safe - QuEChERS) ως μία προσέγγιση στο στάδιο της επεξεργασίας δείγματος (sample preparation) για το προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων. Αναλυτικά η μέθοδος εκδόθηκε για πρώτη φορά το 2003 (M. Anastassiades, SJ Lehotay, Δ. Stajnbaher, FJ Schenck, JAOAC Int 86 (2) 412-31.

Το εργαστήριο υπολειμμάτων της CVUA στη Στουτγάρδη είχε χρησιμοποιήσει τη μέθοδο αυτή για τακτικές αναλύσεις φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά από τις αρχές του 2002 και εκεί ασχολήθηκαν για πρώτη φορά με υπόστρωμα πορτοκαλιού παίρνοντας άριστα αποτελέσματα. Τα επόμενα χρόνια η ίδια μέθοδος τροποποιήθηκε για τη βελτίωση του εύρους των δραστικών ουσιών και του πεδίου εφαρμογής της σε βασικά προϊόντα. Μεγάλης σημασίας ήταν η εισαγωγή της χρήσης των αλάτων, ως buffering, για τη βελτίωση της ανάκτησης αναλυτών, που εξαρτώνται από τη τιμή του pH, και προτάθηκε η ρύθμιση του pH στην τιμή 6 για όλα τα δείγματα. Αυτή η προσέγγιση είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη και την παρουσίαση της μεθόδου ως επίσημη μέθοδο της AOAC 2007.01.

Στάδια της μεθόδου:

- ✓ τεμαχισμός του δείγματος, ζύγιση και τοποθέτηση 10-15g σε δοκιμαστικό σωλήνα 50ml
- ✓ προσθήκη 10 mL ακετονιτρίλιο στο δοκιμαστικό σωλήνα

- ✓ ανακίνηση του σωλήνα με το χέρι για ένα λεπτό
- ✓ μεταφορά του δείγματος και του εκχυλίσματός του σε άλλον δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιέχει 4 g MgSO_4 και 1 g NaCl
- ✓ ανακίνηση και με το χέρι για ένα λεπτό.
- ✓ φυγοκέντρηση του σωλήνα (3000 rcf) για δύο λεπτά
- ✓ μετά τη φυγοκέντρηση έχουν σχηματιστεί διάφορες φάσεις μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα. Μεταφέρουμε ένα μέρος από την οργανική φάση (1 mL) σε κάποιο προσροφητικό μέσο (για παράδειγμα d-SPE, DPX κ.α.), ανάλογα με το δείγμα που χρησιμοποιούμε (φρούτα, λαχανικά κτλ)
- ✓ φυγοκέντρηση του καινούριου εκχυλίσματος
- ✓ μεταφορά του τελικού εκχυλίσματος σε φιαλίδια χρωματογραφίας
- ✓ ανάλυση σε σύστημα χρωματογραφίας

Κατά την εφαρμογή της διαδικασίας ανάλογα με το δείγμα που πρόκειται να εξεταστεί μπορεί να διαφοροποιηθούν οι διάφορες ποσότητες των αλάτων και των διαλυτών αλλά και κάποια στάδια (www.quechers.com).

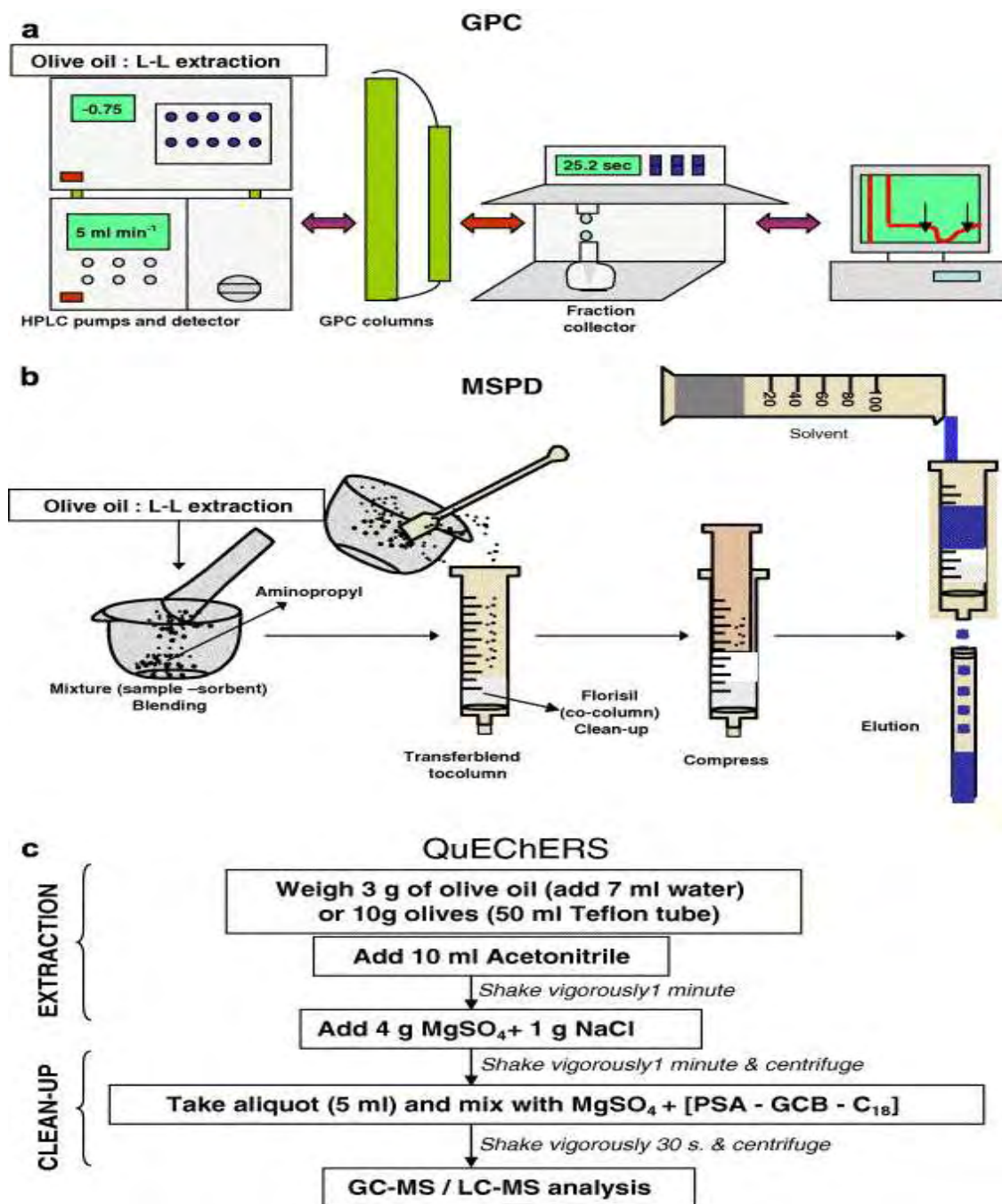
3.9.2. Εφαρμογή της QuEChERS στην ανάλυση καρπών ελιάς και ελαιολάδου για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων

Τα υποστρώματα τόσο της ελιάς όσο και του ελαιολάδου έχουν το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και για το λόγο αυτό απαιτείται διαφορετικός χειρισμός και διαφοροποίηση κάποιων σταδίων που σχετίζεται με όλα τα λιπαρά υποστρώματα. Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της μεθόδου, ο κύριος σκοπός είναι, όσο το δυνατότερο να αποφευχθούν τα πολύπλοκα και χρονοβόρα στάδια.

Γενικά, η τελική μέθοδος για την ανάλυση των καρπών ελιάς για υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων επικυρώθηκε όσον αφορά την ορθότητα και την ακρίβεια της μεθόδου με πειράματα ανάκτησης (υπολογισμός της ανάκτησης και της επαναληψιμότητας) κάνοντας χρήση διάφορων τύπων ανιχνευτών. Από στοιχεία πρόσφατης έρευνας προέκυψαν ικανοποιητικά αποτελέσματα με ανακτήσεις 70-109% και σχετική τυπική

απόκλιση $RSD < 20\%$ για προσδιορισμό υπολειμμάτων σε καρπούς ελιάς με σύστημα GC-MS, ανακτήσεις 88-130% και $RSD < 10\%$ για σύστημα LC-MS/MS, ενώ ιδιαίτερα σημαντικό είναι οι χαμηλές τιμές LOQ (ήταν κάτω από τις τιμές MRL που θέσπισε η Ε.Ε για την ελιά) (Sarah C. Cunha *et al*, 2007).

Στην **Εικόνα 3** παρουσιάζονται συνοπτικά όλες οι διεργασίες που ακολουθούνται στην ανάλυση ελαιολάδου ή ελιάς με τη μέθοδο **QuEChERS** καθώς και με δύο άλλες τεχνικές επεξεργασίας του δείγματος την Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) και την Gel Permeation Chromatography (GPC).



Εικόνα 3. Μεθοδολογία QuEChERS στην ανάλυση ελιάς ή ελαιολάδου σε σύγκριση με άλλες τεχνικές επεξεργασίας του δείγματος (MSPD και GPC) (www.quechers.com)

3.10. Επικύρωση των μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων Φ.Π.

Η **επικύρωση** (Validation) είναι η επιβεβαίωση, μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων, ότι ικανοποιούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις, για μια συγκεκριμένη σκοπούμενη χρήση. Οι αναλυτικές απαιτήσεις της επικύρωσης εντοπίζονται από σαφή καθορισμό του υποστρώματος που αναλύεται, των ενώσεων που προσδιορίζονται καθώς και του εύρους των συγκεντρώσεων για τις οποίες εφαρμόζεται η μέθοδος. Επίσης υπολογίζονται η ορθότητα και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων που προκύπτουν, ο τρόπος έκφρασης των αποτελεσμάτων σε μονάδες και τέλος καθορίζονται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για κάθε αναλύτη.

Ορθότητα (accuracy): Η ορθότητα αναφέρεται στη διαφορά (σφάλμα) μεταξύ της μέσης τιμής μιας σειράς μετρήσεων και της αληθούς τιμής της μετρούμενης ποσότητας. Η αληθής τιμή μπορεί να ληφθεί από το αποτέλεσμα μιας άλλης μεθόδου γνωστής ορθότητας και ακρίβειας μετά από την προσθήκη σε ειδικά εμβολιασμένο δείγμα, ή και από υλικό αναφοράς γνωστής ή γενικά αποδεκτής σύνθεσης. Ο απλούστερος τρόπος εκτίμησης της ορθότητας είναι με πειράματα ανάκτησης, δηλαδή τον προσδιορισμό της ανάκτησης εφαρμόζοντας τη μέθοδο σε δείγματα μάρτυρα (δείγματα τα οποία δεν περιέχουν τον αναλύτη), τα οποία έχουν εμβολιαστεί τεχνητά με γνωστές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Χρησιμοποιούνται διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης εμβολιασμού ώστε να καλύπτουν την υπό μελέτη περιοχή. Συνήθως ένα σημαντικό επίπεδο εμβολιασμού είναι το όριο ποσοτικοποίησης και ένα άλλο το μέγιστο όριο υπολείμματος (MRL). Για κάθε τάξη μεγέθους επίπεδου εμβολιασμού απαιτούνται 2 ως 3 επίπεδα μελέτης. Οι εμβολιασμοί σε κάθε επίπεδο γίνονται σε ορισμένες επαναλήψεις (3 έως 7) και υπολογίζεται η μέση τιμή των ανακτήσεων και η σχετική τυπική απόκλιση τους. Σε περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η ανεύρεση μάρτυρα ή αν ο μάρτυρας περιέχει παρεμποδίζουσες κορυφές, το μικρότερο επίπεδο εμβολιασμού πρέπει να είναι τουλάχιστον 5 φορές μεγαλύτερο από το επίπεδο των παρεμποδίζουσών κορυφών.

Η Ε.Ε. αναφέρει ως αποδεκτές τιμές μέσης εκατοστιαίας ανάκτησης στη ζώνη 70-110% για όλες τις προσδιοριζόμενες ενώσεις σε κάθε επίπεδο εμβολιασμού. Σε πολύ-

υπολειμματικές μεθόδους θεωρείται αποδεκτό να εμφανίζονται και χαμηλότερες τιμές ανάκτησης αλλά θα πρέπει να συνοδεύονται από πολύ καλή επαναληψιμότητα.

Πιστότητα (Precision): Η πιστότητα ή ακρίβεια (*Precision*) των αποτελεσμάτων της αναλυτικής μεθόδου εκφράζεται με την επαναληψιμότητα (*Repeatability*) και την αναπαραγωγιμότητα (*Reproducibility*). Η **Επαναληψιμότητα** είναι η δυνατότητα της μεθόδου να επιτυγχάνονται επαναλήψιμα αποτελέσματα από τον ίδιο αναλυτή κάτω από τις ίδιες συνθήκες ανάλυσης. Για τον έλεγχο αυτό πρέπει να γίνουν τουλάχιστον 3-5 ίδιες επαναλήψεις των πειραμάτων ανάκτησης. Η επαναληψιμότητα εκτιμάται με την % σχετική τυπική απόκλιση (RSD). Τιμές RSD ίσες ή μικρότερες από 20 θεωρούνται αποδεκτές. Η **Αναπαραγωγιμότητα** είναι η ικανότητα της αναπαραγωγής αποτελεσμάτων από διαφορετικούς αναλυτές στο ίδιο εργαστήριο σε μεγάλο χρονικό διάστημα (1-3 εβδομάδες) ή και από άλλα ανεξάρτητα εργαστήρια. Εκτιμάται με % σχετική τυπική απόκλιση (RSD) των αποτελεσμάτων, είτε με αναλύσεις εμβολιασμένων δειγμάτων ή και με επαναλήψεις αναλύσεων πραγματικών δειγμάτων.

Εκλεκτικότητα (Selectivity) και Ειδικότητα (Specificity). Σύμφωνα με την οδηγία 96/46/EC (European Commission, 2000) η ειδικότητα ορίζεται ως η ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει έναν αναλύτη από άλλες ουσίες. Γενικά, ο όρος "ειδική" αναφέρεται σε μια μέθοδο η οποία προσδιορίζει μια μόνο αναλυτέα ένωση ενώ ο όρος "εκλεκτική" αναφέρεται στη μέθοδο η οποία προσδιορίζει διαφορετικές ενώσεις ταυτόχρονα διαχωρίζοντας τη μια από την άλλη. Δηλαδή η απόκριση της μεθόδου σε μια ένωση είναι ξεχωριστή από όλες τις αποκρίσεις όλων των άλλων ενώσεων. Επομένως, με τη χρήση μια πλήρως ειδικής μεθόδου για μια ένωση, η συγκέντρωσή της μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια, ασχέτως της παρουσίας άλλων ουσιών στο δείγμα (η μέθοδος δεν δίνει απόκριση για άλλο χαρακτηριστικό εκτός της αναλυόμενης ένωσης). Μια μέθοδος ονομάζεται πλήρως εκλεκτική, εάν παρέχει ακριβή αναλυτικά αποτελέσματα για τα διάφορα συστατικά του μίγματος χωρίς καμία αλληλεπίδραση μεταξύ τους. **Ο προσδιορισμός της ειδικότητας μεθόδου, μπορεί να γίνει** είτε υπολογίζοντας την % ανάκτηση ενός αναλύτη σε εμβολιασμένα δείγματα σε επίπεδο συγκέντρωσης του αναλύτη και ενώσεων που πιθανώς να παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό (δηλαδή ουσίες με παραπλήσιες φυσικοχημικές με τον αναλύτη ιδιότητες που βρίσκονται στο δείγμα) είτε αναλύοντας τυφλά δείγματα

αντιπροσωπευτικών δειγμάτων όπου οι τυχόν αποκρίσεις των παρεμποδιζουσών ενώσεων δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερες από το 30% της απόκρισης του ορίου ποσοτικοποίησης της μεθόδου για τον αναλύτη.

Ανιχνευσιμότητα (Detectability): Κατά τον προσδιορισμό ενός αναλύτη, που περιέχεται σε μία πολύ μικρή συγκέντρωση σε ένα δείγμα, το αναλυτικό σήμα θα είναι πολύ μικρό. Είναι αρκετά δύσκολο να αποφασιστεί εάν το αυτό το σήμα προέρχεται από τον αναλύτη ή από τον θόρυβο (σήμα υπόβαθρου) που προκαλείται από τη μέθοδο ή από το όργανο. Αυτή η αβεβαιότητα έθεσε την ανάγκη θέσπισης σαφών ορισμών των ορίων ανίχνευσης (limit of detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) ενός αναλύτη με μία μέθοδο.

Το όριο ανίχνευσης (LOD) ορίζεται ως η χαμηλότερη ποσότητα ενός αναλύτη σε ένα δείγμα που μπορεί να ανιχνευτεί με ακρίβεια αλλά όχι απαραίτητα να ποσοτικοποιηθεί.

Για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης χρησιμοποιούνται διάφορες προσεγγίσεις, οι οποίες εξαρτώνται από το εάν η αναλυτική μέθοδος είναι ενόργανη ή μη ενόργανη. Μια προσέγγιση είναι με βάση την οπτική αξιολόγηση (Visual evaluation) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στα δύο είδη αναλυτικών μεθόδων. Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης γίνεται με την ανάλυση δειγμάτων του αναλύτη γνωστής συγκέντρωσης και τον καθορισμό του ελάχιστου επιπέδου συγκέντρωσης στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να ανιχνευθεί αξιόπιστα. Με βάση το λόγο σήμα προς θόρυβο (Signal to Noise - S/N). Η προσέγγιση αυτή εφαρμόζεται μόνο σε αναλυτικές μεθόδους οι οποίες παρουσιάζουν θόρυβος γραμμής βάσεως (Baseline noise). Πρακτικά, θεωρούμε ως όριο ανίχνευσης την ποσότητα του αναλύτη που μας δίνει σήμα τριπλάσιο από το θόρυβο του χρωματογραφικού σήματος ($S/N = 3.3$). Ένας άλλος τρόπος που προκύπτει το LOD είναι με βάση την τυπική απόκλιση (SD) της αναλυτικής απόκρισης (Response) και την κλίση (Slope - b) της καμπύλης αναφοράς. Ο υπολογισμός γίνεται με την ακόλουθη σχέση: $LOD = (3.3 * SD) / b$

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού ή ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation LOQ), είναι το όριο πάνω από το οποίο μπορεί να επιτευχθεί ποσοτική μέτρηση με ικανοποιητικό βαθμό αξιοπιστίας. Πρακτικά, θεωρούμε ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού την ποσότητα του συστατικού που μας δίνει σήμα δεκαπλάσιο από το θόρυβο του χρωματογραφικού σήματος ($S/N = 10$). Το όριο ποσοτικοποίησης πρέπει ακολούθως να πιστοποιηθεί ως προς

την αξιοπιστία του, με την ανάλυση ενός ικανοποιητικού αριθμού δειγμάτων που είναι γνωστό ότι περιέχουν τον αναλύτη σε συγκέντρωση ίση με το όριο ποσοτικοποίησης.

Γραμμικότητα (Linearity): Η γραμμικότητα του συστήματος ανίχνευσης, είναι επιθυμητή αλλά δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση και δεν είναι εξασφαλισμένη σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων. Στις περιπτώσεις που ενδιαφέρει η μελέτη της γραμμικότητας ενός ανιχνευτή για μια προσδιοριζόμενη ουσία, θα πρέπει να ελέγχεται η γραμμικότητα σε 5 τουλάχιστον συγκεντρώσεις οι οποίες να καλύπτουν όλο το εύρος της περιοχής μετρήσεων της αναλυτικής μεθόδου.

Η γραμμικότητα αποδεικνύεται με εξέταση του διαγράμματος της απόκρισης του ανιχνευτή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Τα αποτελέσματα του ελέγχου αυτού αξιολογούνται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους, συνήθως, με εξέταση της ευθείας παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Ο συντελεστής συσχέτισης (correlation coefficient, r) ή ο συντελεστής προσδιορισμού (determination coefficient R^2), η τεταγμένη επί την αρχή, η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης και το άθροισμα τετραγώνων των υπολοίπων είναι οι παράμετροι που μπορούν να εξεταστούν. Για να θεωρηθεί η γραμμική η σχέση μεταξύ απόκρισης και συγκέντρωσης στατιστικά σημαντική θα πρέπει ο συντελεστής συσχέτισης να έχει τιμές $> 0,98$. Εάν δεν είναι γραμμική η συσχέτιση είναι δυνατόν να περιοριστεί η περιοχή συγκεντρώσεων, ώστε να καταστεί γραμμική.

Ευαισθησία (Sensitivity) της μεθόδου είναι η ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει μικρές διαφορές συγκέντρωσης μάζας του αναλύτη. Πρακτικά είναι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης. Μια μέθοδος χαρακτηρίζεται ευαίσθητη όταν οι μικρές αλλαγές συγκέντρωσης ποσότητας αναλύτη προκαλούν μεγάλες αλλαγές μετρούμενης απόκρισης. Αρκετές φορές γίνεται σύγκριση μεταξύ των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και της ευαισθησίας της μεθόδου. Όταν μια μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύσει (προσδιορίσει) χαμηλές συγκεντρώσεις (ποσότητες) ενός αναλύτη δεν σημαίνει ότι είναι ευαίσθητη αλλά ότι η μέθοδος έχει υψηλή ανιχνευσιμότητα ή ότι το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι πολύ χαμηλό (www.eurachem.org/guides)

Αντοχή (Ruggedness): είναι η πιστότητα της μεθόδου όταν τα δείγματα αναλύονται κάτω από κανονικές συνθήκες αλλά με την πραγματοποίηση μικρών αλλαγών στις συνθήκες περιβάλλοντος ή/και χειρισμών (διαφορετικά όργανα, θερμοκρασία χρόνος κ.α.).

Ανθεκτικότητα (Robustness): Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας (*Robustness*) μιας αναλυτικής μεθόδου πρέπει να εξετάζεται στη φάση της ανάπτυξής της, και δείχνει την επιδεκτικότητα της μεθόδου σε σχέση με προσχεδιασμένες μεταβολές στις πειραματικές παραμέτρους της. Η συνέπεια της αξιολόγησης της ανθεκτικότητας μιας μεθόδου είναι η καθιέρωση μιας σειράς *παραμέτρων καταλληλότητας του συστήματος (System suitability testing)* για να εξασφαλιστεί η διατήρηση της αξιοπιστίας της αναλυτικής μεθόδου όταν αυτή χρησιμοποιείται.

Ασφάλεια (Safety): Η έννοια της ασφάλειας (Safety) της αναλυτικής μεθόδου είναι πολύ δύσκολο να χαρακτηριστεί ποσοτικά. Τα αναλυτικά όργανα κατά κανόνα είναι ασφαλή, εφόσον τηρούνται οι κανόνες ασφαλείας τους. Οι διάφορες αναλυτικές διαδικασίες είναι κατά κανόνα ασφαλείς όταν εκτελούνται σύμφωνα με τις οδηγίες των προτύπων ασφαλείας και ληφθούν οι απαραίτητες προφυλάξεις. Ο μόνος παράγοντας κινδύνου που φαίνεται να είναι σημαντικός κατά την επιλογή μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η χρήση επικίνδυνων αντιδραστηρίων. Οι κίνδυνοι αυτοί μπορούν να μειωθούν σε σημαντικό βαθμό με τη χρήση ειδικών συσκευών ή με εξειδικευμένη εκπαίδευση σύμφωνα με τους κανόνες Καλής Εργαστηριακής Πρακτικής (Good Laboratory Practice - GLP).

Κόστος (Cost): Η μηχανοποίηση και αυτοματοποίηση ενός οργάνου μπορεί να αυξήσει το κόστος (Cost) εφαρμογής μιας αναλυτικής μεθόδου. Αυτό όμως είναι επιτακτική ανάγκη καθώς με αυτό τον τρόπο μπορεί να μειωθεί σημαντικά ο κίνδυνος λαθών που μπορεί να γίνουν από τον αναλυτή και επιπλέον αυξάνεται ο αριθμός των αναλύσεων ανά χρονική περίοδο, αφού βελτιστοποίηση της ακρίβειας σημαίνει περισσότερες επαναλήψεις. Κατά την κοστολόγηση της ανάλυσης λαμβάνονται υπόψη, η τιμή του οργάνου και ο χρόνος απόσβεσης, το κόστος εργασίας, ο χρόνος ανάλυσης και το κόστος των αντιδραστηρίων.

Αβεβαιότητα της μέτρησης

Σύμφωνα με την EURACHEM/CITAC 2000, η **αβεβαιότητα** (uncertainty) ορίζεται ως η παράμετρος που συνδέεται με το αποτέλεσμα της μέτρησης και χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών της. Η αβεβαιότητα αναφέρεται ως **τυπική αβεβαιότητα** (standard uncertainty, u) και εκφράζεται ως τυπική απόκλιση. Η **συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα** (combined standard uncertainty) είναι η αβεβαιότητα που προκύπτει από το συνδυασμό των τυπικών αβεβαιοτήτων που εισάγει κάθε συνιστώσα και δίνεται ως η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των τυπικών αβεβαιοτήτων κάθε συνιστώσας. Η **διευρυμένη αβεβαιότητα** (expanded uncertainty, U) χρησιμοποιείται για να καλύψει τις απαιτήσεις των τελικών χρηστών της μέτρησης και εκφράζει ένα μεγαλύτερο διάστημα από αυτό της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας, εντός του οποίου η τιμή του μετρούμενου μεγέθους έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να υπάρξει. Η διευρυμένη αβεβαιότητα υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη συνδυασμένη αβεβαιότητα με ένα συντελεστή κάλυψης (coverage factor) k , ο οποίος στις χημικές μετρήσεις λαμβάνει συνήθως την τιμή 2 και αντιστοιχεί σε επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95 %.

Η Αβεβαιότητα διακρίνεται σε δύο κατηγορίες σύμφωνα με τη μέθοδο εκτίμησης τους. Η αβεβαιότητα τύπου Α εκτιμάται μέσα από μία σειρά επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, κάνοντας χρήση στατιστικές μεθόδους και η αβεβαιότητα τύπου Β Υπολογίζεται μέσα από άλλες τεχνικές πλην της στατιστικής όπως για παράδειγμα με πιστοποιητικά διακριβώσεων ή δεδομένα από προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες, αποτελέσματα βασισμένα στην εμπειρία και οποιαδήποτε άλλη πληροφορία (eur-lex.europa.eu).

Όταν γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης μιας ουσίας το αποτέλεσμα αποτελεί μόνο μία εκτίμηση της αληθούς τιμής. Το αποτέλεσμα της μέτρησης αποκλίνει από την πραγματική τιμή εξαιτίας των συστηματικών και τυχαίων σφαλμάτων. Τα τυχαία σφάλματα προσδιορίζονται με πειράματα επαναληψιμότητας και δεν μπορούν να διορθωθούν, μπορούν όμως να μειωθούν αυξάνοντας τον αριθμό των μετρήσεων. Τα συστηματικά σφάλματα είναι δυσκολότερο να ποσοτικοποιηθούν.

Τα στάδια εκτίμησης της αβεβαιότητας σύμφωνα με τον οδηγό της EURACHEM είναι:

- **Προδιαγραφή του μετρούμενου συστατικού** καταγράφοντας με σαφήνεια τι ακριβώς μετρείται καθώς και η διατύπωση μιας ποσοτικής σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου συστατικού και των παραμέτρων από τους οποίους υπολογίζεται.
- **Ταυτοποίηση των πηγών αβεβαιότητας** για κάθε παράμετρο, δημιουργώντας ένα κατάλογο από τις πιθανές πηγές αβεβαιότητας. Στον κατάλογο αυτό θα περιλαμβάνονται και πηγές αβεβαιότητας παραμέτρων που δεν εμφανίζονται στην εξίσωση υπολογισμού του προσδιοριζόμενου συστατικού.
- **Ποσοτικοποίηση της τυπικής αβεβαιότητας (u) κάθε πηγής** υπολογίζοντας την αβεβαιότητα κάθε συστατικού ως έκφραση τυπικής απόκλισης ή σχετικής τυπικής απόκλισης.
- **Υπολογισμός της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας (U_c)** ακολουθώντας το νόμο διάδοσης σφαλμάτων. Επειδή οι πηγές αβεβαιότητας έχουν συνήθως διαφορετικές μονάδες, η συνδυασμένη αβεβαιότητα υπολογίζεται ως σχετική τυπική αβεβαιότητα.
- **Υπολογισμός της διευρυμένης τυπικής αβεβαιότητας (U)** χρησιμοποιώντας τον συντελεστή κάλυψης $k=2$ (95%). Η διευρυμένη αβεβαιότητα U είναι: $U = 2 * U_c$

ΜΕΡΟΣ II

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1.1. Αντιδραστήρια και Διαλύτες

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραματικών δοκιμών και για την εφαρμογή της μεθόδου στις αναλύσεις πραγματικών δειγμάτων ήταν τα εξής:

- Ακετονιτρίλιο (HPLC Grade, Fisher Scientific - 99,99%)
- Τολουόλιο (Pestiscan Grade, LAB-SCAN - 99,8%)
- Ακετόνη (Analytical Reagent Grade, Fisher Scientific- 99,99%)
- Νερό (HPLC Gradient grade, Fisher Scientific)
- MgSO_4 Anhydrous – Άνυδρο θειικό μαγνήσιο (Analytical Reagent, SIGMA ALDRICH - $\geq 99,5\%$)
- NaCl (Analytical Reagent, Mallinckrodt Chemical Works).

Επίσης στο πείραμα της εκτίμησης του συντελεστή συγκέντρωσης του cypermethrin από την ελιά στο λάδι χρησιμοποιήθηκε το σκεύασμα ASSIST EC με δραστική ουσία cypermethrin (με 10% w/v).

1.2. Δραστικές ουσίες και πρότυπα διαλύματα

Οι φυτοπροστατευτικές δραστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι χρόνοι κατακράτησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**. Η επί τοις εκατό καθαρότητα των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των μητρικών προτύπων διαλυμάτων, ήταν από 97,9 έως 99,4%.

Τα μητρικά πρότυπα διαλύματα κάθε δραστικής ουσίας παρασκευάστηκαν σε ακετόνη σε συγκέντρωση 1000 mg/L και φυλάχθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 10 mL στους -20 °C.

Από τα μητρικά πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκε ένα πρότυπο μικτό διάλυμα συγκέντρωσης 20 mg/ L με τις επτά δραστικές ουσίες (a-Endosulfan, b-Endosulfan, Endosulfan sulfate, Bifenthrin, Lambda cyhalothrin, cypermethrin, Deltamethrin) σε ακετόνη. Με την κατάλληλη αραιώση αυτού παρασκευάστηκε το πρότυπο μικτό διάλυμα εργασίας συγκέντρωσης 2 mg/L σε ακετόνη, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ανάκτησης για τους εμβολιασμούς των εδώδιμων ελαίων.

Για τη βαθμονόμηση και για τον έλεγχο της γραμμικότητας του χρωματογραφικού σήματος του ανιχνευτή παρασκευάστηκαν πρότυπα μικτά διαλύματα βαθμονόμησης τόσο σε τολουόλιο (πρότυπα σε καθαρό διαλύτη), όσο και τα αντίστοιχης συγκέντρωσης μικτά πρότυπα διαλύματα σε εκχύλισμα υποστρώματος.

Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων μικτών διαλυμάτων βαθμονόμησης που παρασκευάστηκαν ήταν 0,0076 - 0,015 - 0,03 - 0,076 - 0,15 - και 0,30 mg/ L. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν ώστε να υπάρχει αντιστοίχιση των συγκεντρώσεων των τελικών διαλυμάτων έκχυσης που προέκυπταν από τα πειράματα ανάκτησης με τις συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων βαθμονόμησης.

1.3. Υλικά και όργανα – Εξοπλισμός

Για την προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων καθώς και για την προετοιμασία των δειγμάτων, δηλαδή για την εκχύλιση και τον καθαρισμό του εκχυλίσματος, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω σκεύη και όργανα:

- Εργαστηριακός ζυγός ακριβείας (Kern ALS 220-4)
- Ομογενοποιητής Vortex
- Σύστημα ομοιογενοποίησης Ultra Turrex
- Φυγόκεντρος, (Hettich Universal) για τη φυγοκέντρωση των εκχυλισμάτων

- Συσκευή συμπίκνωσης – ξήρανσης με ρεύμα αζώτου.
- Thermomix Vorwerk
- Θερμόμετρο για έλεγχο θερμοκρασίας
- Αερογράφος για το ψεκασμό των ελαίων με το φ.π. Cypermethrin
- Τυποποιημένοι πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρου με περιεχόμενο για εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS της εταιρείας Thermo Scientific - 150 mg MgSO_4 / 50 mg CUPSA/ 50 mg CEC18/ 50 mg CUCARB – 2 mL Centrifuge Tubes.
- Γυάλινα φιαλίδια των 25 και 40 mL σκούρου χρώματος, ογκομετρικοί κύλινδροι των 10 mL, σιφώνια πλήρωσης των 2, 5, και 10 mL, μικροσύριγγες των 500, 250, 100, και 50 μL , γυάλινες σύριγγες των 10 mL, ογκομετρικές φιάλες, ποτήρια ζέσεως.
- Σύστημα αέριας χρωματογραφίας τύπου Hewlett Packard 6890, εφοδιασμένο με χρωματογραφική στήλη (30m x 250 μm x 0.25 μm nominal) τύπου BPX-5 (35% *Phenyl-Polysilphenylene-Siloxane*) και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).

1.4. Εκχύλιση υπολειμμάτων από edώδιμα έλαια(καλαμποκέλαιο, ηλιέλαιο και ελαιόλαδο)

Εφαρμόστηκε κατά βάση η μέθοδος QuEChERS όπως έχει ήδη αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας για το ελαιόλαδο και αναπτύχθηκαν δοκιμές αφενός με εφαρμογή της σε άλλα edώδιμα έλαια αλλά και αφετέρου με έλεγχο μερικών σταδίων της για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της εκχύλισης και στους τρεις τύπους edώδιμων ελαίων.

Μέθοδος εκχύλισης

- Ζύγιση 3,0 g edώδιμου ελαίου σε γυάλινο σωλήνα με βιδωτό πώμα.
- Προσθήκη στο γυάλινο σωλήνα 7ml νερού HPLC, 10 mL ακετονιτριλίου, 4g MgSO_4 και 1g NaCl.

- Ανακίνηση του σωλήνα με το χέρι για 1min και ακολούθως ισχυρή ανάδευση σε Vortex για 1min.
- Παραμονή του γυάλινου σωλήνα σε ηρεμία σε σκοτεινό χώρο για περίπου 30 min ώστε να ολοκληρωθεί η κατανομή και ο διαχωρισμός των φάσεων.
- Παραλαβή 2mL από την επάνω φάση (οργανική φάση) του εκχυλίσματος και μεταφορά του σε τυποποιημένους πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης, που περιέχουν 0,15 g MgSO_4 , 0,05g PSA , 0,05g C_{18} και 0,05 g CUCARB.
- Ισχυρή ανακίνηση των πλαστικών σωλήνων φυγοκέντρησης με το χέρι.
- Φυγοκέντρηση των πλαστικών σωλήνων φυγοκέντρησης για 2min στις 4000 στροφές/min.
- Παραλαβή 1ml εκχυλίσματος και μεταφορά τους σε φιαλίδια χρωματογραφίας.
- Εξάτμιση του διαλύτη (ακετονιτρίλιο) σε ρεύμα χαμηλής ροής αζώτου
- Επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος με 500μL τολουόλιο και ανάδευση για πλήρη ομογενοποίηση του τελικού εκχυλίσματος.

Οι μέθοδοι εκχύλισης, όπως περιγράφονται παραπάνω, οδηγούν σε ένα συντελεστή συμπύκνωσης ίσο με 0,6 gr υποστρώματος ανά mL τελικού ενέσιμου διαλύματος.

1.5. Έλεγχος αναλυτικής διαδικασίας - Πειράματα ανάκτησης σε εδώδιμα έλαια

Οι εμβολιασμοί στα αντίστοιχα υποστρώματα ηλιελαίου και καλαμποκέλαιου (έλαια προερχόμενα από βιολογική παραγωγή) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση πρότυπων μικτών διαλυμάτων 20 mg/L ή 2mg/L σε ακετόνη σε προζυγισμένο δείγμα ελαίου (3,0g). Οι εμβολιασμοί έγιναν με στόχο να προκύψουν τρία επίπεδα συγκέντρωσης φυτοπροστατευτικών ουσιών και στα τρία εδώδιμα έλαια (καλαμποκέλαιο, ηλιέλαιο και

ελαιόλαδο). Αυτά τα επίπεδα ήταν 0,05 mg/Kg, 0,1 mg/Kg, 0,5 mg/Kg. Σε κάθε επίπεδο εμβολιασμού πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις, δηλαδή σε κάθε επίπεδο εμβολιάστηκαν πέντε ξεχωριστά δείγματα.



Εικόνα 4. Διαχωρισμός φάσεων σε εμβολιασμό καλαμποκέλαιου

Μετά τον εμβολιασμό σε υπόστρωμα καλαμποκέλαιου και την ανακίνηση διαχωρίζονται οι φάσεις (εικόνα 4). Παρατηρείται ότι ως ίζημα έχουμε τα άλατα, πάνω από τα άλατα είναι η φάση του νερού, ακολουθεί η φάση-στρώμα του λαδιού και πάνω το εκχύλισμα (φάση με ακετονιτρίλιο).

Ακολουθώντας τις προαναφερόμενες μεθόδους εκχύλισης, καθαρισμού και χρωματογραφικής ανάλυσης, αναλύθηκαν δείγματα μάρτυρα (control) από βιολογικά εδώδιμα έλαια καθώς και δείγματα λευκού προσδιορισμού (blanc) για τον έλεγχο της αναλυτικής διαδικασίας. Με αυτό τον τρόπο ακολούθησε ο έλεγχος πιθανής παρουσίας χρωματογραφικών κορυφών που να παρεμποδίζουν τη καταγραφή των χρωματογραφικών κορυφών των δραστικών ουσιών στους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης. Η μέτρηση της αναπαραγωγιμότητας της εφαρμοζόμενης μεθόδου έγινε με εμβολιασμό δείγματος καλαμποκέλαιου σε επίπεδο 0,5mg/kg με πρότυπο πυκνό διάλυμα 20 mg/L σε ακετόνη. Η

μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η QuEChERS, αντίστοιχα έγινε και το πρότυπο διάλυμα σε υπόστρωμα (std.matrix corn oil) 0,3μg/ml.

1.6. Πείραμα εκτίμησης του συντελεστή συγκέντρωσης του cypermethrin από την ελιά στο λάδι

Σύμφωνα με πρόσφατα αποτελέσματα ελέγχου ελαιολάδων αλλά και τα αποτελέσματα των αναλύσεων των δειγμάτων ελαιολάδου στην παρούσα εργασία η πλέον συχνά συναντούμενη Φυτοπροστατευτική ουσία είναι το Cypermethrin. Καθώς δεν έχουν προβλεφθεί τιμές Ανώτατων Επιτρεπτών Ορίων (MRLs) για τα υπολείμματα φ.ο. στο λάδι, αλλά τα υπάρχοντα αναφέρονται μόνο στην ελιά και θεωρείται ότι ισχύουν και για το παραγόμενο ελαιόλαδο σχεδιάσαμε και εκτελέσαμε μια πειραματική διαδικασία για να εκτιμηθεί ο συντελεστής συμπίκνωσης (συντελεστής μεταφοράς από την ελιά στο λάδι) της ουσίας αυτής από την ελιά στο λάδι. Η διαδικασία αυτή περιελάμβανε το εργαστηριακό ψεκασμό ποσότητας ελιών με το σκεύασμα ASSIST EC (10% σε Cypermethrin), τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας στο δείγμα αυτό , την εργαστηριακή ελαιοποίηση του ψεκασμένου δείγματος και την παραγωγή ελαίου και τέλος τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων του Cypermethrin στο παραχθέν έλαιο.

Συγκεκριμένα παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα ψεκαστικού υγρού συγκέντρωσης 2mg δ.ο./mL. Ανάλογα με το επίπεδο της δραστικής ουσίας στο δείγμα καρπών από το πυκνό διάλυμα παρασκευάστηκαν δύο αραιά διαλύματα (ένα 0, 06 mg/ml για το επίπεδο εμβολιασμού 0, 3 mg/Kg και ένα 0, 03 mg/mL για το επίπεδο εμβολιασμού 0, 15 mg/Kg). Με τη βοήθεια του αερογράφου, όγκου 5 mL από το ψεκαστικό υγρό (αραιό) εφαρμόστηκε σε δείγμα 1Kg καρπών ελιάς βιολογικής παραγωγής. Ο ψεκασμός επαναλήφθηκε εις τριπλούν με διαφορετικά δείγματα ελιών ώστε να υπάρχουν τρεις επαναλήψεις του πειράματος της ελαιοποίησης. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και την επόμενη ημέρα σε δύο επαναλήψεις αυτή τη φορά από το ίδιο ψεκαστικό υγρό ίδιας συγκέντρωσης.

Μετά το ψεκασμό αφήσαμε τις ελιές για 24ώρες σε δροσερό και σκοτεινό μέρος του εργαστηρίου και ακολούθησε η επεξεργασία του δείγματος για την ελαιοποίηση και τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων του Cypermethrin στον καρπό και στο λάδι.

Αρχικά το δείγμα των καρπών ομογενοποιήθηκε – πολτοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (για σύντομο χρονικό διάστημα, 2 min) στο Thermomix, και λήφθηκε αναλυτικό δείγμα για τον υπολογισμό των υπολειμμάτων στον καρπό. Ακολούθησε η ελαιοποίηση με μάλαξη σε θερμοκρασία 37-40°C στο Thermomix (ταχύτητα 3). Κατά τη διάρκεια της θερμομάλαξης που διήρκεσε 45 min έγινε προσθήκη νερού θερμοκρασίας 40°C σε δύο δόσεις (2x50mL)

Μετά τη μάλαξη περάσαμε το ομογενοποιημένο πολτό από ένα ύφασμα προκειμένου να γίνει ο διαχωρισμός των σπασμένων πυρήνων από την ελαιοζύμη. Μετά το διαχωρισμό ζυγίστηκαν τόσο η ποσότητα της ελαιοζύμης όσο και αυτή των πυρήνων. Ακολούθως, η Ελαιοζύμη τοποθετημένη σε φυγοκεντρικούς σωλήνες φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm για 5min. Η υπερκείμενη υγρή φάση, δηλαδή το παραχθέν ελαιόλαδο, αφαιρέθηκε με πιπέτα και τοποθετήθηκε σε γυάλινα φιαλίδια όπου και ζυγίστηκε. Η διαδικασία της φυγοκέντρησης και απομάκρυνσης της υπερκείμενης υγρής φάσης επαναλήφθηκε μέχρι τη μη παραλαβή ελαιολάδου στην υπερκείμενη φάση.

Για κάθε μεταχείριση παραλαμβάναμε περίπου 10-12g ελαιόλαδο/100g εαλιόμαζας.



Εικόνα 5. Διαχωρισμός των φάσεων κατά την εργαστηριακή ελαιοποίηση

Ο συντελεστής επεξεργασίας του cypermethrin στο ελαιόλαδο προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη σχέση : $F = \text{Coil}/\text{Ck}$, F συντελεστής επεξεργασίας ελαιολάδου

Coil η συγκέντρωση του cypermethrin στο παραγόμενο ελαιόλαδο

Ck η συγκέντρωση του cypermethrin στον ελαιόκαρπο

1.6.1. Εκχύλιση δειγμάτων Ελιάς για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων cypermethrin

Για την εκχύλιση της ελιάς χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Ethyl Acetate (Etac), Πιο αναλυτικά ζυγίστηκαν 4g ελαιοζύμης από την εργαστηριακή ελαιοποίηση, προστέθηκαν 20mL ethyl acetate και ακολούθησε ομογενοποίηση του δείγματος σε Ultra turex και φυγοκέντρωση για 5min. Στη συνέχεια, 15 mL από το εκχύλισμα πήγαν για εξάτμιση σε περιστροφικό εξάτμιστήρα και μετά επαναδιάλυση με 5 mL ACN(ακετονιτρίλιο) και τοποθέτηση σε Ultra sonic vortex για καλύτερη διάλυση και τέλος τοποθέτηση στη κατάψυξη για πάνω από 2h. Μετά το πέρας των δύο και ωρών πήραμε 1 mL για καθαρισμό (clean-up) σε φιαλίδιο το οποίο μετά φυγοκεντρήθηκε για διαχωρισμό των φάσεων και μεταφέραμε 500 µL σε φιαλίδιο χρωματογραφίας. Μετά αλλαγή διαλύτη και συμπύκνωση σε ρεύμα N και τέλος επαναδιάλυση με 500 µL ισοκτάνιο τολουόλιο.

Για τον έλεγχο των αναλυτικών χαρακτηριστικών της ακολουθούμενης μεθόδου για την ανάλυση ελιάς πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο πειράματα ανάκτησης του Cypermethrin μετά από εμβολιασμό ομογενοποιημένου καρπού ελιάς που προέρχονταν από βιολογική παραγωγή. Ακολούθως παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα 2,5mg/ L σε ακετόνη σε προζυγισμένο δείγμα καρπού ελιάς (10g). Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με στόχο να προκύψουν τρία επίπεδα συγκέντρωσης Cypermethrin στους καρπούς ελιάς. Αυτά τα επίπεδα ήταν 0,05 mg/kg 0,1mg/kg και 0,5 mg/kg Κάθε εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε από πέντε επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο. Τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα ήταν σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Μετά τον εμβολιασμό ακολούθησε η μέθοδος εκχύλισης της QuEChERS με καθαρισμό και χρωματογραφική ανάλυση,

αναλύθηκαν δείγματα μάρτυρα (control) από βιολογικούς καρπούς ελιάς καθώς και δείγματα λευκού προσδιορισμού (blanc) για τον έλεγχο της αναλυτικής διαδικασίας. Με αυτό τον τρόπο ακολούθησε ο έλεγχος παρουσίας χρωματογραφικών κορυφών που να παρεμποδίζουν τη καταγραφή των χρωματογραφικών κορυφών του cypermethrin στους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης (το Cypermethrin) εμφανίζει τρεις κορυφές που αντιστοιχούν στα ισομερή του και προσδιορίζεται ως άθροισμα των επιφανειών και των τριών αυτών κορυφών).

1.6.2. Εκχύλιση Ελαιολάδου για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων cypermethrin

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η QuEChERS με κάποιες τροποποιήσεις, πιο αναλυτικά:



Εικόνα 6. Ελαιόλαδο από εργαστηριακή ελαιοποίηση

Ζύγιση 3,0 g ελαιολάδου, που προέκυψε από την ελαιοποίηση, σε γυάλινο σωλήνα με βιδωτό πώμα. Προσθέτουμε 7ml H₂O και 10 ml ACN και 4g MgSO₄ και 1g NaCl. Συνεχίζουμε με ανακίνηση σε vortex για 1min. Παίρνουμε 2 mL εκχυλίσματος και ακολουθεί καθαρισμός (clean-up) σε φιαλίδια των 5mL. Με 0,30g αλάτων ακολουθεί

φυγοκέντρωση για 5min στις 4000στροφές/min. Στη συνέχεια παραλαμβάνονται 500μL από το εκχύλισμα σε ACN(ακετονιτρίλιο) και μεταφορά σε φιαλίδια χρωματογραφίας. Μετά ακολουθεί εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου και επαναδιάλυση με 500 μL τολουόλιο.

Η παραπάνω μέθοδος εκχύλισης της QuEChERS οδηγεί σε ένα συντελεστή συμπύκνωσης 0,3g υποστρώματος λαδιού.

1.7. Δείγματα ελαίων που αναλύθηκαν

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε 8 πραγματικά δείγματα εδώδιμων ελαίων, των οποίων η προμήθεια έγινε από εμπορικά καταστήματα της περιοχής. Αυτά τα δείγματα ήταν κραμβέλαιο, ηλιέλαιο (10% ελαϊκό οξύ), αραβοσιτέλαιο, μείγμα ελαίων (40% κραμβέλαιο, 30% αραβοσιτέλαιο, 20% ηλιέλαιο) διαφόρων εταιρειών.



Εικόνα 7. Ανάλυση Δειγμάτων Εμπορίου

Επίσης η μέθοδος εφαρμόστηκε σε 8 πραγματικά δείγματα ελαιολάδου των οποίων η προμήθεια έγινε από τη λαϊκή αγορά του Βόλου ή από ελαιοτριβεία διαφόρων περιοχών.

Για τα πειράματα ανάκτησης και για τις δοκιμές στην βελτιστοποίηση και την αποτίμηση της μεθόδου αλλά και για την παρασκευή των μικτών προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης σε εκχύλισμα υποστρώματος χρησιμοποιήθηκαν έλαια (ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο και ελαιόλαδο) βιολογικής καλλιέργειας. Τα προϊόντα αυτά ελέγχθηκαν για την παρουσία υπολειμμάτων Φ.Ο. της μελέτης και βρέθηκαν απαλλαγμένα από την παρουσία τους.

1.8. Προσδιορισμός των Φ.Ο. με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD)

Για τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας της Hewlett Packard με στήλη τύπου BPX-5 και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων τύπου micro (μECD).

Η καταγραφή και επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε σε H/Y με το πρόγραμμα Chem Station.

Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν οι ακόλουθες:

- Εγχυτής δείγματος σε λειτουργία “pulsed-splitless”
- Θερμοκρασία εγχυτή 260 °C.
- Όγκος έγχυσης δείγματος 1μL.
- Θερμοκρασία ανιχνευτή 310 °C.
- Αέρια ανιχνευτή: N₂ (60mL/min).
- Φέρον αέριο He, με ροή 1,2mL/min.

- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης: αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 100°C και διατήρησή της για 1,60 min, αύξηση με ρυθμό $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ μέχρι τους 210°C και παραμονή για 16 min, αύξηση με ρυθμό ανόδου $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ μέχρι τους 280°C και παραμονή για 7 min.

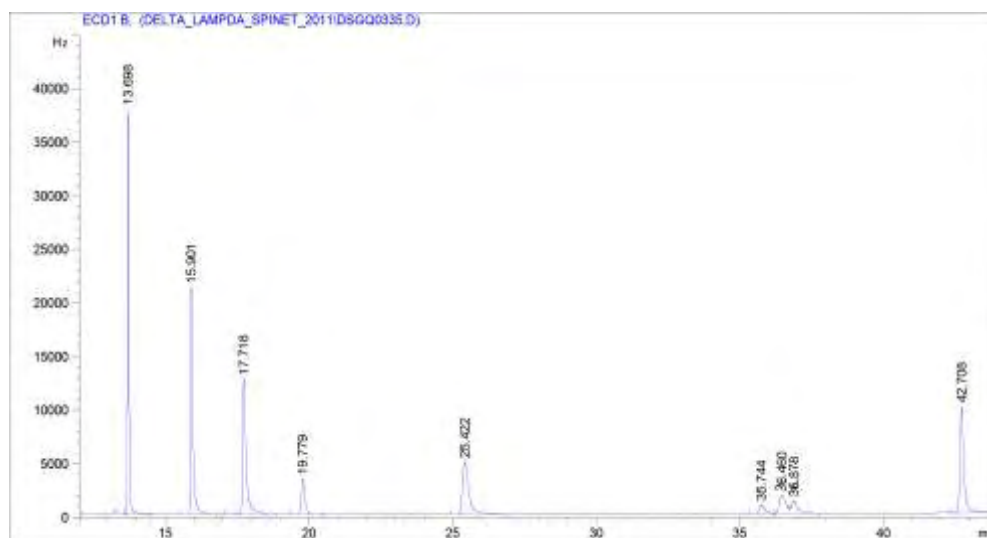
Ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφικού χρόνου της ανάλυσης ήταν 58,93 min. Η ποσοτικοποίηση του χρωματογραφικού σήματος έγινε με την τεχνική του εξωτερικού προτύπου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.1. Διαχωρισμός των δραστικών ουσιών

Οι χρωματογραφικές συνθήκες που επιλέχθηκαν και εφαρμόστηκαν για την ανάλυση των φυτοπροστατευτικών ουσιών (Φ.Ο.) - στόχων της μελέτης επιφέρουν ικανοποιητικό διαχωρισμό σε σχετικά σύντομο χρόνο ανάλυσης, αν λάβουμε υπόψη τη φύση αυτών των ουσιών, όπως προκύπτει από τα χρωματογραφήματα που παρουσιάζονται παρακάτω (εικόνα 8 και πίνακας 7).

Οι χρόνοι κατακράτησης για κάθε δραστική ουσία όπως καταγράφηκαν στο χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε, παρουσίασαν ιδιαίτερη σταθερότητα για χρονικό διάστημα 3 εβδομάδων εμφανίζοντας μικρή τυπική απόκλιση (πίνακα 7) . Το Cypermethrin, εμφανίζεται με τρεις κορυφές που αντιστοιχούν στα ισομερή του.



Εικόνα 8. Χρωματογράφημα μίγματος προτύπου διαλύματος των επτά φυτοπροστατευτικών ουσιών - στόχων σε τολουόλιο και συγκέντρωσης 0,3mg δ.ο./L για κάθε μία.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην επεξεργασία του δείγματος και στην επιλογή των παραμέτρων της χρωματογραφικής ανάλυσης εξασφαλίζει σε γενικές γραμμές την απουσία χρωματογραφικών κορυφών, οι οποίες παρεμποδίζουν τις κορυφές των δραστικών ουσιών - στόχων όπως φαίνεται από τα χρωματογραφήματα εκχυλίσματος μάρτυρα για υπόστρωμα ηλιελαίου, καλαμποκέλαιου, ελαιολάδου, καρπών ελιάς και του λευκού της αναλυτικής διαδικασίας, τα οποία παρουσιάζονται στις **εικόνες 9-13**.

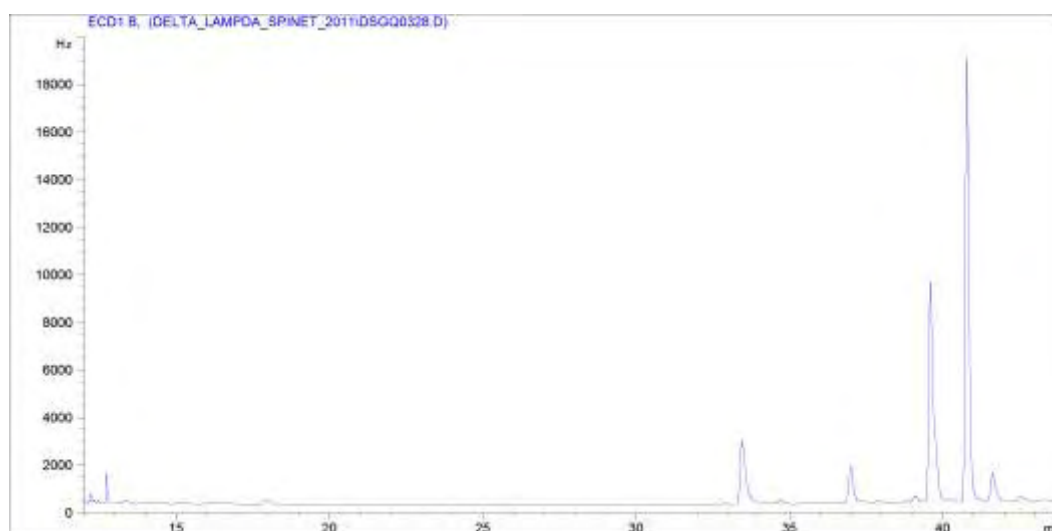
Πίνακας 7. Χρόνοι κατακράτησης (Retention Time), τυπική απόκλιση τους για τις 7 δραστικές ουσίες της μελέτης στο χρησιμοποιηθέν χρωματογραφικό σύστημα (BPX-5 και ECD) και για χρονικό διάστημα τριών εβδομάδων.

Δραστικές Ουσίες	Χρόνοι κατακράτησης \pm SD (n=15)	CV%
a-Endosulfan	13,6 \pm 0,02	0,15
β - Endosulfan	15,8 \pm 0,03	0,19
Endosulfan sulfate	17,7 \pm 0,02	0,11
Bifenthrin	19,7 \pm 0,03	0,20
Lampda Cyhalothrin	25,3 \pm 0,04	0,16
Cypermethrin I	35,7 \pm 0,02	0,06
Cypermethrin II	36,4 \pm 0,04	0,11
Cypermethrin III	36,8 \pm 0,02	0,05
Deltamethrin	42,6 \pm 0,02	0,05

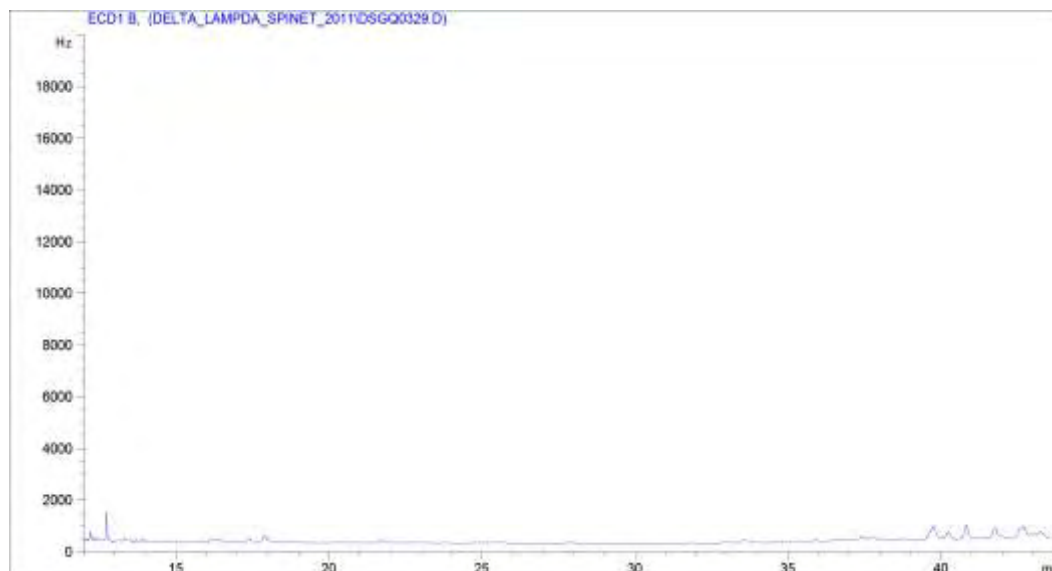
Η ταυτοποίηση των ουσιών σε κάθε χρωματογράφημα έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης των ουσιών. Η εφαρμογή της τεχνικής του χρόνου κατακράτησης

προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι χρωματογραφικές κορυφές σε άγνωστα δείγματα ελαίων ευνοείται από το γεγονός, ότι στα παραπάνω χρωματογραφήματα εμφανίζεται σταθερή γραμμή βάσης, χαμηλός θόρυβος στο χρωματογραφικό σήμα, ακρίβεια στην εμφάνιση του χρόνου κατακράτησης για κάθε δραστική ουσία και απουσία άλλων κορυφών (όπως προκύπτει από τα παρουσιαζόμενα χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων μάρτυρα για το κάθε υπόστρωμα) που πιθανόν να παρεμπόδιζαν τις ουσίες στόχους.

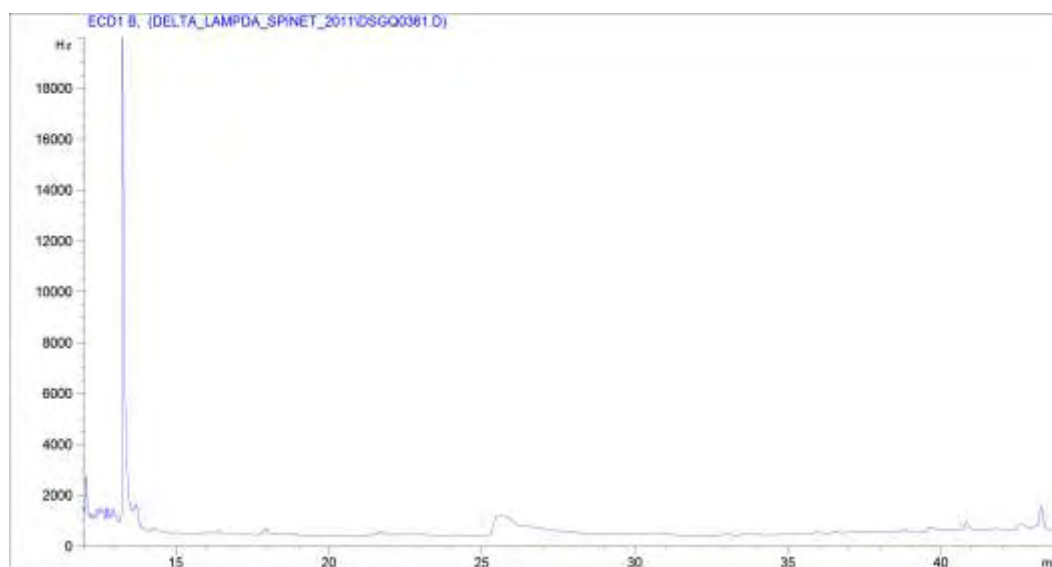
Όσον αφορά την επιβεβαίωση, είναι απαραίτητα και πρόσθετα αναλυτικά στοιχεία, όπως για παράδειγμα το κριτήριο του χρόνου κατακράτησης σε διαφορετικό χρωματογραφικό σύστημα ή και επιβεβαίωση των ευρημάτων με ανάλυση σε συζευγμένο σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματογραφίας μαζών. Από τα πρόσθετα αυτά στοιχεία στη παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε κυρίως ο χρόνος κατακράτησης σε διαφορετικά χρωματογραφικά συστήματα και σε συγκεκριμένες περιπτώσεις η ανάλυση σε σύστημα GC-MS.



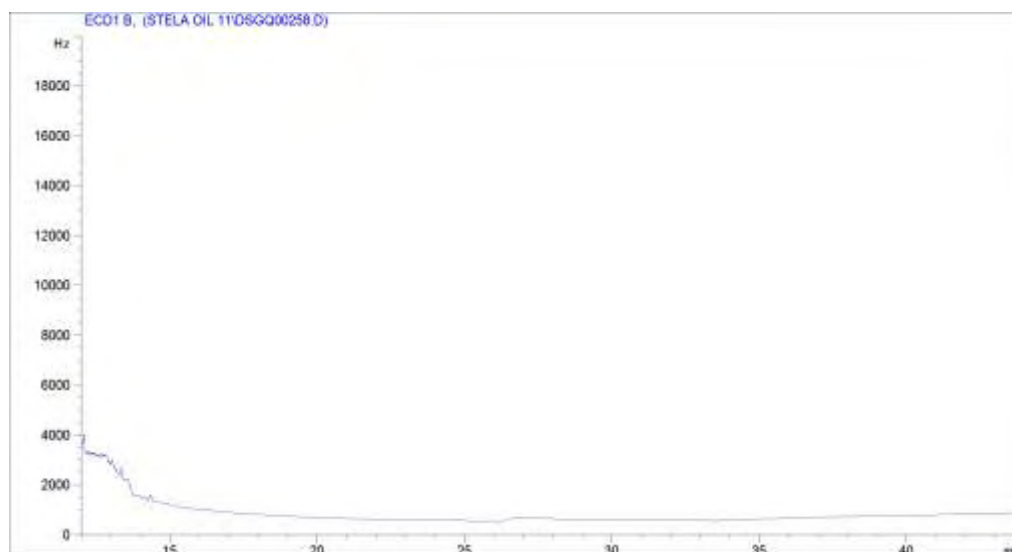
Εικόνα 9. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος μάρτυρα για το υπόστρωμα ηλιέλαιο



Εικόνα 10. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος μάρτυρα για το υπόστρωμα καλαμποκέλαιο (βιολογικής παραγωγής καλαμποκέλαιο).



Εικόνα 11. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος μάρτυρα για το υπόστρωμα ελαιόλαδο (βιολογικής παραγωγής ελαιόλαδο).



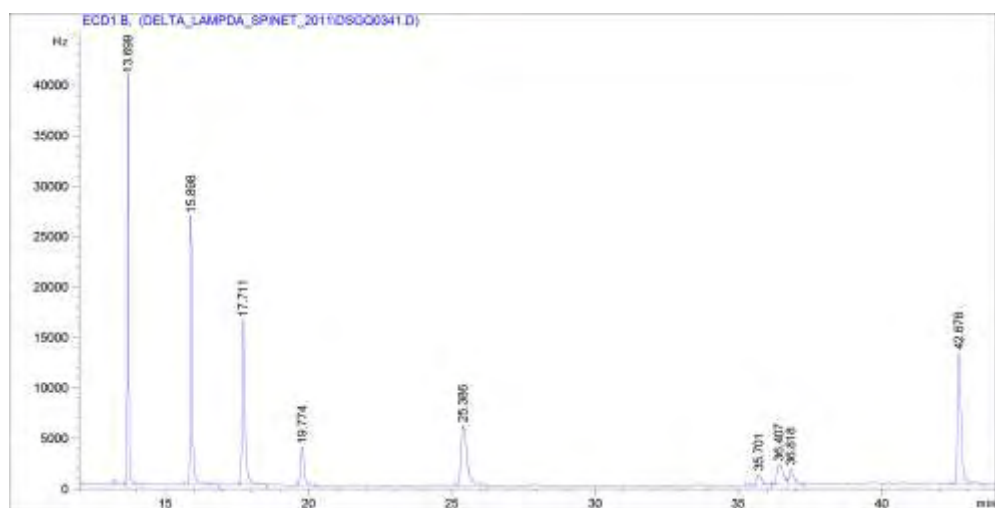
Εικόνα 12. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος μάρτυρα για το υπόστρωμα καρπών ελιάς (αψέκαστοι καρποί ελιάς)



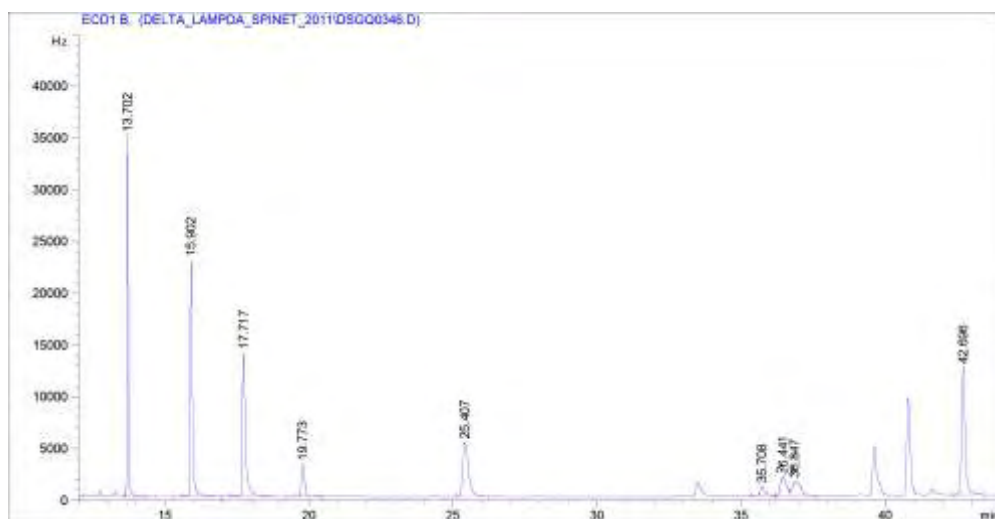
Εικόνα 13. Χρωματογράφημα που αντιστοιχεί στο λευκό (blank) της ακολουθούμενης αναλυτικής διαδικασίας

Στις παρακάτω **εικόνες 14-17** παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των μικτών πρότυπων διαλυμάτων των φυτοπροστατευτικών ουσιών – στόχων συγκέντρωσης 0,3mg/L

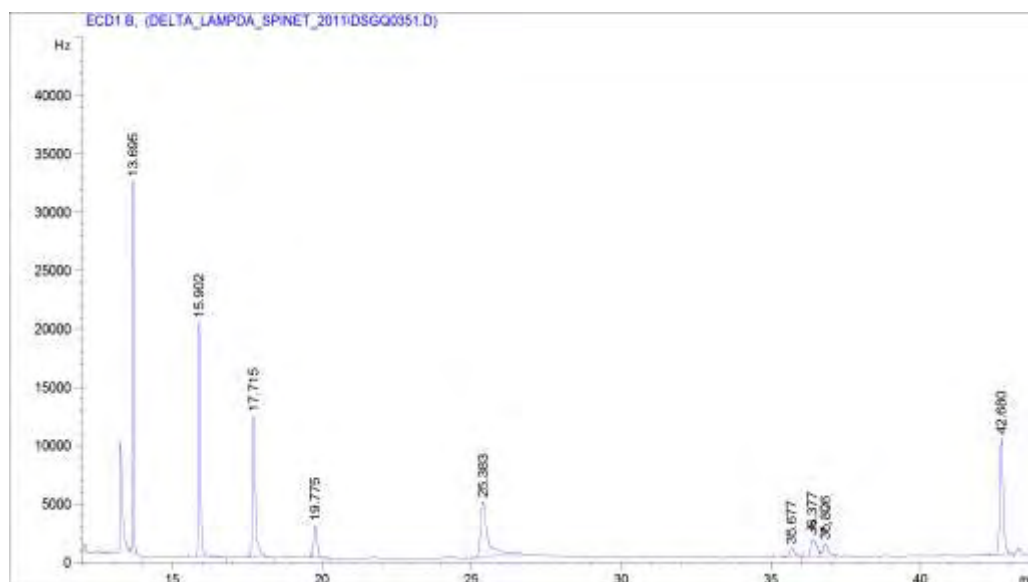
για τη κάθε ουσία σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου, ηλιελαίου, ελαιολάδου καθώς και σε εκχύλισμα υποστρώματος καρπών ελιάς (0,3 mg/kg).



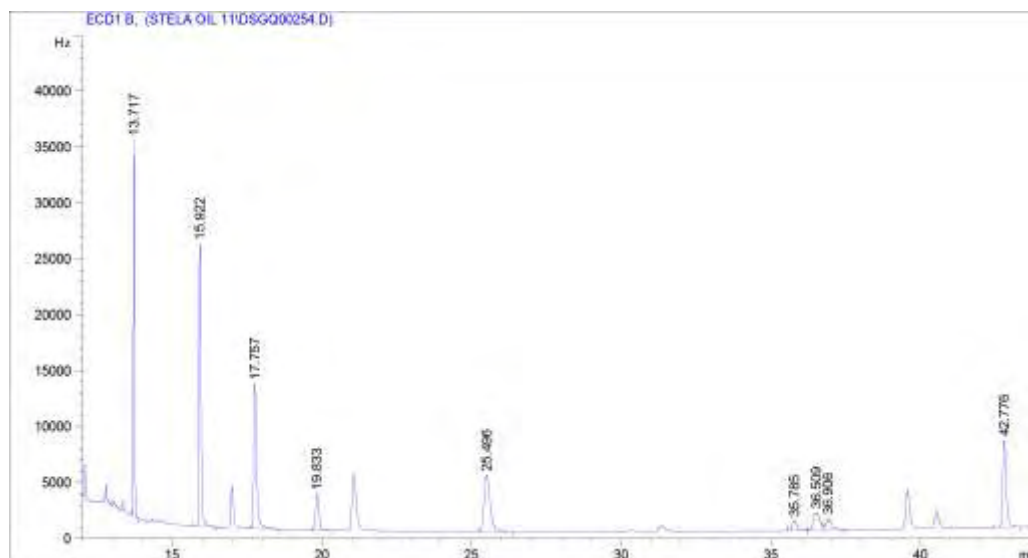
Εικόνα 14. Χρωματογράφημα μίγματος προτύπου διαλύματος των φυτοπροστατευτικών ουσιών - στόχων, συγκέντρωσης 0,3mg/L για κάθε δραστική ουσία, σε υπόστρωμα καλαμποκέλαιου.



Εικόνα 15. Χρωματογράφημα μίγματος προτύπου διαλύματος των φυτοπροστατευτικών ουσιών – στόχων συγκέντρωσης 0,3mg/L για κάθε δραστική ουσία, σε υπόστρωμα ηλιελαίου.



Εικόνα 16. Χρωματογράφημα μίγματος προτύπου διαλύματος των φυτοπροστατευτικών ουσιών – στόχων συγκέντρωσης 0,3mg/L για κάθε δραστική ουσία, σε υπόστρωμα ελαιολάδου.



Εικόνα 17. Χρωματογράφημα μίγματος προτύπου διαλύματος των φυτοπροστατευτικών ουσιών – στόχων, συγκέντρωσης 0,3mg/kg για κάθε δραστική ουσία, σε υπόστρωμα καρπών ελιάς.

2.2. Ποσοτική ανάλυση – Καμπύλες Βαθμονόμησης

Για την ποσοτικοποίηση του χρωματογραφικού σήματος χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του εξωτερικού προτύπου. Συγκεκριμένα, παράχθηκαν καμπύλες αναφοράς ή καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε μία δραστική ουσία και πραγματοποιήθηκε έλεγχος γραμμικότητας του χρωματογραφικού ανιχνευτή με έγχυση πρότυπων διαλυμάτων σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0,03 έως 0,30mg/L. Για την ποσοτικοποίηση του Cypermethrin, χρησιμοποιήθηκε το άθροισμα των επιφανειών των κορυφών που αντιστοιχούν στα στερεοϊσομερή του (Cypermethrin I, Cypermethrin II, Cypermethrin III).

Επιπλέον, για να ελέγξουμε αν έχουμε επίδραση υποστρώματος στη χρωματογραφική απόκριση προχωρήσαμε στην παραγωγή καμπύλης αναφοράς για κάθε δραστική ουσία τόσο με έγχυση πρότυπων διαλυμάτων σε διαλύτη (τολουόλιο) όσο και πρότυπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα του κάθε υποστρώματος, δηλαδή σε υπόστρωμα ελαιολάδου, καλαμποκέλαιου και ηλιελαίου. Στο **πίνακα 8** που ακολουθεί παρουσιάζονται για κάθε δραστική ουσία οι εξισώσεις της καμπύλης αναφοράς καθώς και ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) που προέκυψαν τόσο από εκχύσεις πρότυπων σε διαλύτη όσο και από εκχύσεις πρότυπων σε εκχύλισμα υποστρώματος. Από τις τιμές του R^2 προκύπτει η εξασφάλιση της γραμμικότητας του χρωματογραφικού σήματος στο υπό μελέτη εύρος των συγκεντρώσεων των φυτοπροστατευτικών ουσιών (0,03μg/ml - 0,30μg/ml), καθώς οι τιμές του κυμαίνονται από 0,9934 έως 0,9996.

Από τη σύγκριση της κλίσης της καμπύλης αναφοράς κάθε δραστικής ουσίας που παράχθηκε με πρότυπα διαλύματα σε εκχύλισμα υποστρώματος (a_m) με τη κλίση της καμπύλης με πρότυπα διαλύματα σε διαλύτη (a_s) προκύπτει η εκτίμηση και μπορεί να υπολογιστεί ο βαθμός ή μη του υποστρώματος στο χρωματογραφικό σήμα. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές (Λιαπής K, 2003) θετική επίδραση υποστρώματος εμφανίζεται όταν ο λόγος των κλίσεων a_m/a_s είναι μεγαλύτερος από 1,10 ή από 1,15, ενώ αρνητική επίδραση ή συμπίεση του χρωματογραφικού σήματος εμφανίζεται όταν ο λόγος των κλίσεων a_m/a_s είναι μικρότερος από 0,85 ή από 0,90.

Πίνακας 8. Χαρακτηριστικά καμπύλων αναφοράς (εξίσωση και συντελεστής γραμμικότητας R^2) που παρήχθησαν για τις δραστικές ουσίες της μελέτης από πρότυπα διαλύματα σε εκχύλισμα υποστρώματος ηλιελαίου και ελαιολάδου και σε διαλύτη. Εκτίμηση της επίδρασης υποστρώματος με τον υπολογισμό του λόγου της κλίσης των καμπυλών αναφοράς σε εκχύλισμα υποστρώματος (a_m) προς την κλίση των καμπυλών αναφοράς σε διαλύτη (a_s)

<i>Δραστική Ουσία</i>	<i>Πρότυπα Διαλύματα σε εκχύλισμα υποστρώματος ηλιελαίου</i>	<i>Πρότυπα Διαλύματα σε εκχύλισμα υποστρώματος ελαιολάδου</i>	<i>Πρότυπα Διαλύματα σε διαλύτη τολουόλιο</i>	<i>Εκτίμηση επίδρασης υποστρώματος ηλιελαίου</i>	<i>Εκτίμηση επίδρασης υποστρώματος ελαιολάδου</i>
<i>Εύρος συγκέντρωσης (0,03-0,3μg/ml)</i>	$y = a_m x + b \quad R^2$	$y = a_m x + b \quad R^2$	$y = a_s x + b \quad R^2$	a_m / a_s	a_m / a_s
<i>α- Endosulfan</i>	$y = 115514x - 75,837 \quad 0,9969$	$y = 107719x - 402,57 \quad 0,9994$	$y = 122176x + 1088 \quad 0,9991$	0,94	0,88
<i>β- Endosulfan</i>	$y = 76058x - 283,1 \quad 0,9967$	$y = 67810x - 365,79 \quad 0,9982$	$y = 69632x + 272,98 \quad 0,9997$	1,09	0,97
<i>Endosulfan sulfate</i>	$y = 46726x - 321,49 \quad 0,9977$	$y = 40848x - 297,72 \quad 0,9959$	$y = 41794x - 26,673 \quad 0,9997$	1,12	0,97
<i>Bifenthrin</i>	$y = 10156x + 81,878 \quad 0,9978$	$y = 9121,8x + 49,061 \quad 0,9991$	$y = 10623x + 84,582 \quad 0,9995$	0,95	0,85
<i>Lampda cyhalothrin</i>	$y = 17734x - 219,59 \quad 0,9934$	$y = 16404x - 166,35 \quad 0,9992$	$y = 16489x - 169,03 \quad 0,9964$	1,07	0,99
<i>Cypermethrin</i>	$y = 240346x - 4571,9 \quad 0,9969$	$y = 161475x + 1122,6 \quad 0,9524$	$y = 172445x - 2313,4 \quad 0,9808$	1,21	0,93
<i>Deltamethrin</i>	$y = 39348x - 19429 \quad 0,9587$	$y = 31553x + 132,54 \quad 0,9761$	$y = 33802 - 247,28 \quad 0,9978$	1,16	0,93

Πίνακας 9. Χαρακτηριστικά καμπυλών αναφοράς (εξίσωση και R^2 που παρήχθησαν για τις δραστικές ουσίες της μελέτης από πρότυπο διάλυμα σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου και σε διαλύτη. Εκτίμηση της επίδρασης υποστρώματος (a_m) προς την κλίση των καμπυλών αναφοράς σε διαλύτη (a_s).

<i>Δραστική Ουσία</i>	<i>Πρότυπα διαλύματα σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου</i>	<i>Πρότυπα διαλύματα σε διαλύτη Τολουόλιο</i>	<i>Εκτίμηση επίδρασης υποστρώματος καλαμποκέλαιου a_m / a_s</i>
<i>Εύρος συγκέντρωσης (0,03-0,3μg/ml)</i>	$Y = a_m x + b \quad R^2$	$Y = a_s x + b \quad R^2$	
<i>α-Endosulfan</i>	$y = 140311x - 2377 \quad 0,9824$	$y = 122176x + 1088 \quad 0,9991$	<i>1,15</i>
<i>β- Endosulfan</i>	$y = 90759x - 1258 \quad 0,9885$	$y = 69632x + 272,98 \quad 0,9997$	<i>1,30</i>
<i>Endosulfan sulfate</i>	$y = 55772x - 893,73 \quad 0,9893$	$y = 41794x - 26,673 \quad 0,9997$	<i>1,33</i>
<i>Bifenthrin</i>	$y = 12550x - 141 \quad 0,9865$	$y = 10623x + 84,582 \quad 0,9995$	<i>1,18</i>
<i>Lampda cyhalothrin</i>	$y = 20053x - 313,37 \quad 0,9869$	$y = 16489x - 169,03 \quad 0,9964$	<i>1,22</i>
<i>Cypermethrin</i>	$y = 208276x - 2341,2 \quad 0,9922$	$y = 172445x - 2313,4 \quad 0,9808$	<i>1,21</i>
<i>Deltamethrin</i>	$y = 45431x - 911,72 \quad 0,9935$	$y = 33802 - 247,28 \quad 0,9978$	<i>1,34</i>

Σύμφωνα με τις τιμές του λόγου a_m / a_s που προέκυψαν (πίνακες 8 και 9) παρατηρείται ότι η πιο έντονη εμφάνιση του φαινομένου της επίδρασης υποστρώματος εμφανίζεται για όλες τις δραστικές ουσίες στο υπόστρωμα καλαμποκέλαιου. Σε υπόστρωμα ηλιελαίου θετική επίδραση υποστρώματος παρουσιάζεται στις ουσίες Endosulfan sulfate, Cypermethrin και Deltamethrin, για τις οποίες η τιμή του λόγου των κλίσεων είναι **1,12**, **1,21** και **1,16** αντίστοιχα. Σε υπόστρωμα ελαιολάδου, η εικόνα αλλάζει εντελώς καθώς δεν

εμφανίζεται σημαντική επίδραση υποστρώματος αφού οι τιμές του λόγου a_m/a_s κυμαίνονται από 0,85 έως 0,99. Τα αποτελέσματα αυτά για το ελαιόλαδο και για σύστημα ανάλυσης GC (BPX-5) – ECD είναι παρόμοια με αποτελέσματα που έχουν προκύψει για τις Πυρεθρίνες και τα ισομερή endosulfan από άλλες μελέτες σχετικά με την αξιολόγηση αναλυτικών μεθοδολογιών για την ανάλυση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε ελαιόλαδο (Βεράνη Στ., 2011).

Πρέπει επίσης να λάβουμε υπόψη ότι το φαινόμενο της επίδρασης υποστρώματος (matrix effect) μερικές φορές εξαρτάται και από τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο εγχυόμενο διάλυμα (Λιαπής Κ, 2003) καθώς μπορεί να εμφανιστεί ιδιαίτερα έντονο σε μία μόνο ζώνη συγκεντρώσεων. Για το λόγο αυτό εκτός από τον έλεγχο της κλίσης των καμπυλών αναφοράς, που παρουσιάζεται στους **πίνακες 8 και 9**, πραγματοποιήθηκε και ο έλεγχος της σύγκρισης των χρωματογραφικών αποκρίσεων σε κάθε ένα από τα επίπεδα συγκέντρωσης των εκχυόμενων διαλυμάτων και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **πίνακα 10**. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά η σύγκριση του λόγου των χρωματογραφικών αποκρίσεων (a_m/a_s) από το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης προς το υψηλότερο επίπεδο δεν παρουσιάζει μεγάλη απόκλιση τιμών. Συγκεκριμένα, στο καλαμποκέλαιο που έχουμε θετική επίδραση υποστρώματος ο λόγος των χρωματογραφικών αποκρίσεων για το εύρος των συγκεντρώσεων (0,03 - 0,30μg/ml) κυμαίνεται από 0,9 έως 1,2 για τα ισομερή Endosulfan και Bifenthrin, από 1,1 έως 1,3 για Lampda cyhalothrin και Deltamethrin, ενώ για το Cypermethrin ο λόγος μειώνεται από 1,5 σε 1,2 κάτι το οποίο παρατηρείται και σε υπόστρωμα ελαιολάδου (το οποίο δεν εμφανίζει θετική επίδραση υποστρώματος), όπου οι τιμές κυμαίνονται από 1,9 σε 1 αντίστοιχα. Στις υπόλοιπες δραστικές ουσίες ο λόγος των αποκρίσεων σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων παρουσιάζει μία σταθερότητα γύρω στο 0,8 και 0,9 σε υπόστρωμα ελαιολάδου εκτός από το Deltamethrin που κυμαίνεται από 1,6 στην χαμηλότερη συγκέντρωση έως 1 στην υψηλότερη συγκέντρωση. Όσον αφορά το ηλιέλαιο ο λόγος είναι σταθερός 0,8-0,9 εκτός από τις ουσίες που εμφανίζει θετική επίδραση υποστρώματος σύμφωνα με το **πίνακα 8**, δηλαδή στο Endosulfan sulfate (από 1 έως 1,1), Cypermethrin (1,1-1,3) και Deltamethrin(1,5-1,3).

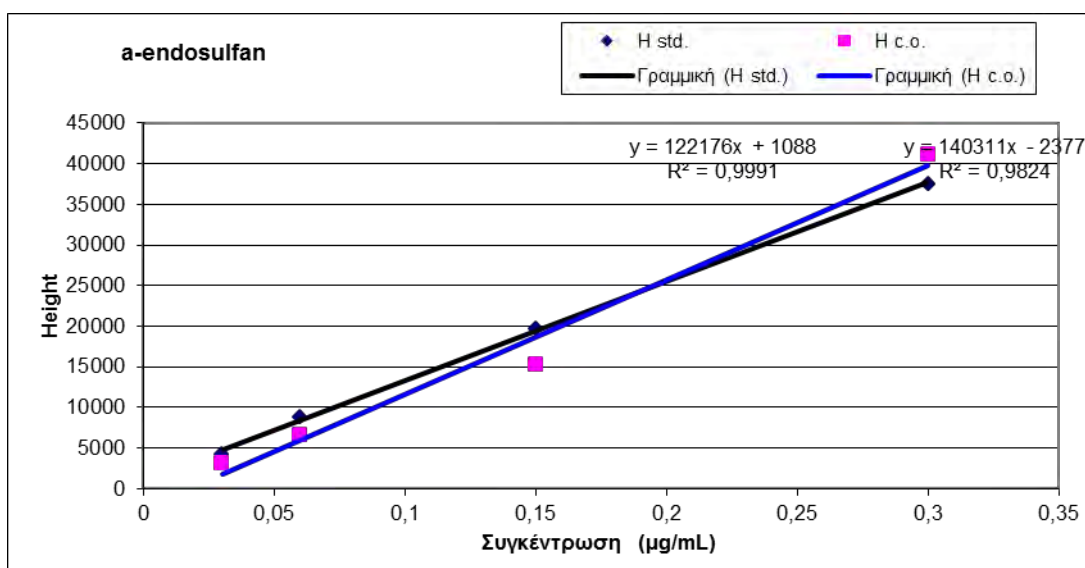
Για τους λόγους αυτούς και θεωρώντας αφενός ικανοποιητική τη γραμμικότητα που παρουσιάζουν οι καμπύλες αναφοράς στη ζώνη των συγκεντρώσεων που εργαστήκαμε και αφετέρου όχι ιδιαίτερα σημαντική την όποια διαφοροποίηση προκύπτει σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης χρησιμοποιήσαμε για όλες τις διαδικασίες ποσοτικοποίησης τις καμπύλες αναφοράς που παράχθηκαν από την έκχυση πρότυπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα υποστρώματος για το ανάλογο υπόστρωμα μελέτης.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα σύγκρισης των χρωματογραφικών αποκρίσεων σε κάθε ένα από τα επίπεδα συγκέντρωσης των δραστικών ουσιών των εκχυόμενων διαλυμάτων σε υπόστρωμα καλαμποκέλαιου, ηλιελαίου και ελαιολάδου προς το πρότυπο διάλυμα σε διαλύτη τολουόλιο.

<i>Εδώδιμα έλαια</i> <i>Επίπεδα προτύπων</i> <i>διαλυμάτων</i> <i>(μg/ml)</i>	Δραστικές Ουσίες και λόγος χρωματογραφικών αποκρίσεων τους (a_m/a_s) ανά επίπεδο συγκέντρωσης για τα τρία υποστρώματα της μελέτης						
<i>Καλαμποκέλαιο</i>	<i>α-Endosulfan</i>	<i>β-Endosulfan</i>	<i>Endosulfan sulfate</i>	<i>Bifenthrin</i>	<i>Lampda cyhalothrin</i>	<i>Cypermethrin</i>	<i>Deltamethrin</i>
0,03	0,9	0,9	1	0,9	1,1	1,5	1,1
0,06	0,9	0,9	0,9	0,9	1,1	1,1	1,1
0,15	0,9	0,9	1	0,8	1	1,3	1
0,3	1	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,3
<i>Ηλιέλαιο</i>							
0,03	0,9	1	1	0,9	1	1,1	1,5
0,06	0,8	0,9	0,9	0,9	1	0,8	1,9
0,15	0,8	0,9	1	0,9	1	1,7	0,8
0,3	0,9	1	1,1	0,9	1	1,3	1,3
<i>Ελαιόλαδο</i>							
0,03	0,8	0,9	1	0,9	0,9	1,6	1,6
0,06	0,7	0,8	0,9	0,8	0,9	0,8	1,4
0,15	0,7	0,9	0,9	0,8	1	1	0,7
0,30	0,9	1	1	0,9	0,9	1	1

Κάτω από καθορισμένες και σταθερές πειραματικές συνθήκες η επιφάνεια (εμβαδόν) των κορυφών των χρωματογραφημάτων είναι μέτρο ποσοτικοποίησης των αντίστοιχων συστατικών στο εξεταζόμενο δείγμα. Έτσι, η συγκέντρωση των δραστικών ουσιών της μελέτης για κάθε αναλυτικό δείγμα υπολογίστηκε από την επιφάνεια των κορυφών των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιώντας παράλληλα την καμπύλη αναφοράς για κάθε ουσία και το συντελεστή συμπύκνωσης κατά την προετοιμασία του δείγματος, που για τη ακολουθούμενη μέθοδο είναι 0,6 g ελαίου / ml εκχυόμενου διαλύματος.

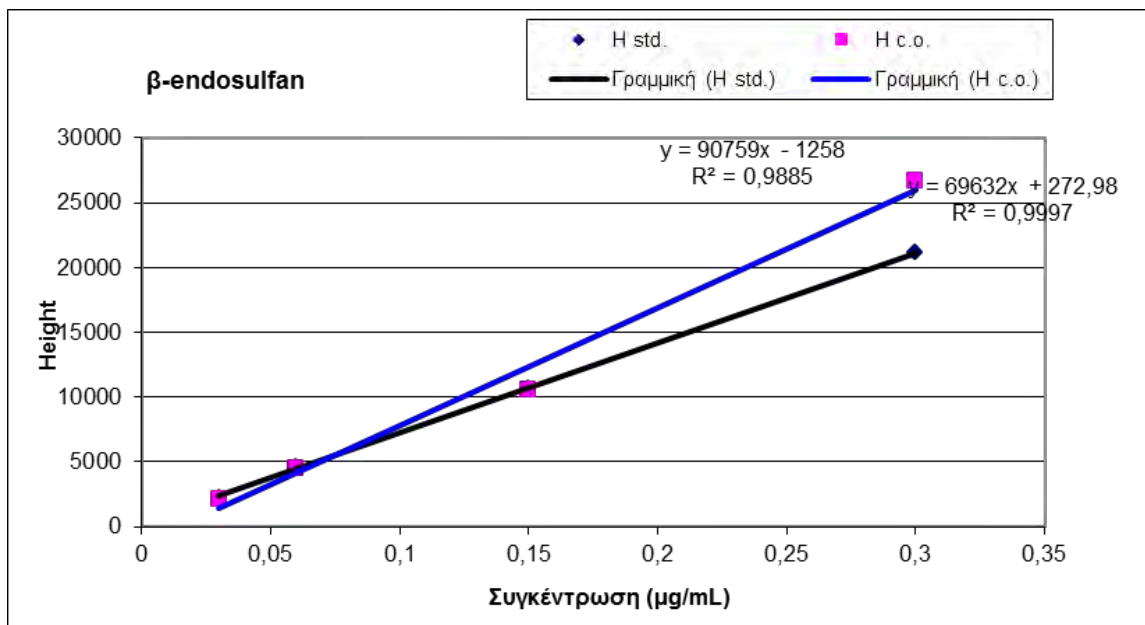
Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται για όλες τις δραστικές ουσίες ταυτόχρονα και οι καμπύλες αναφοράς τους σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου (**διάγραμμα 1-7**), ηλιελαίου (**διάγραμμα 8-9**) και σε διαλύτη και αναδεικνύεται η εμφάνιση ή όχι του φαινομένου της επίδρασης υποστρώματος.



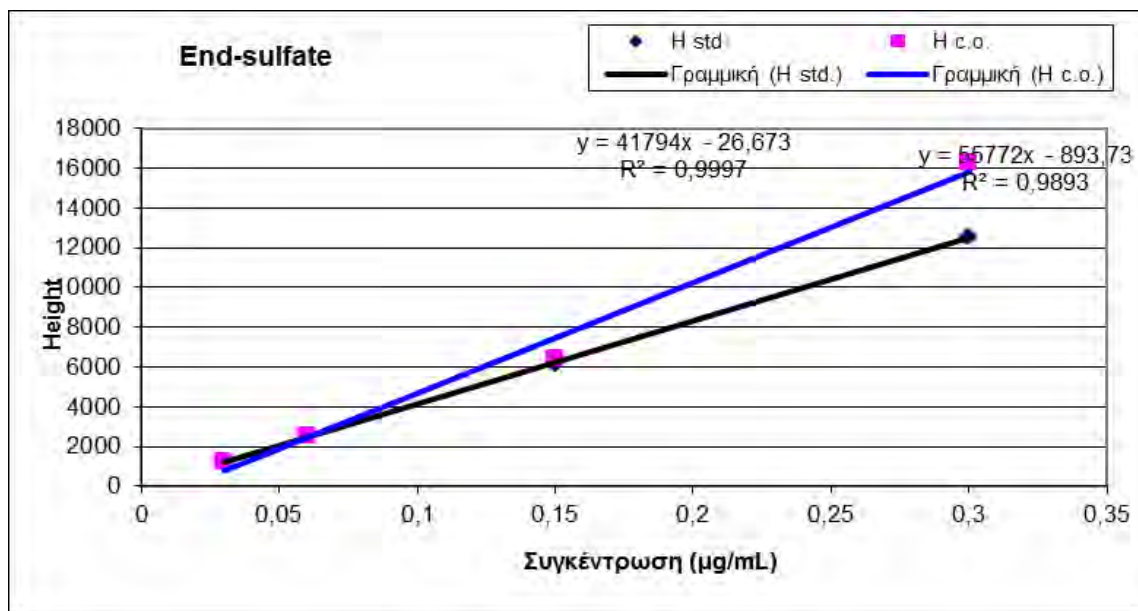
Διάγραμμα 1. Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία a- Endosulfan σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου

H c.o: ύψος κορυφής προτύπου σε υπόστρωμα καλαμποκέλαιου,

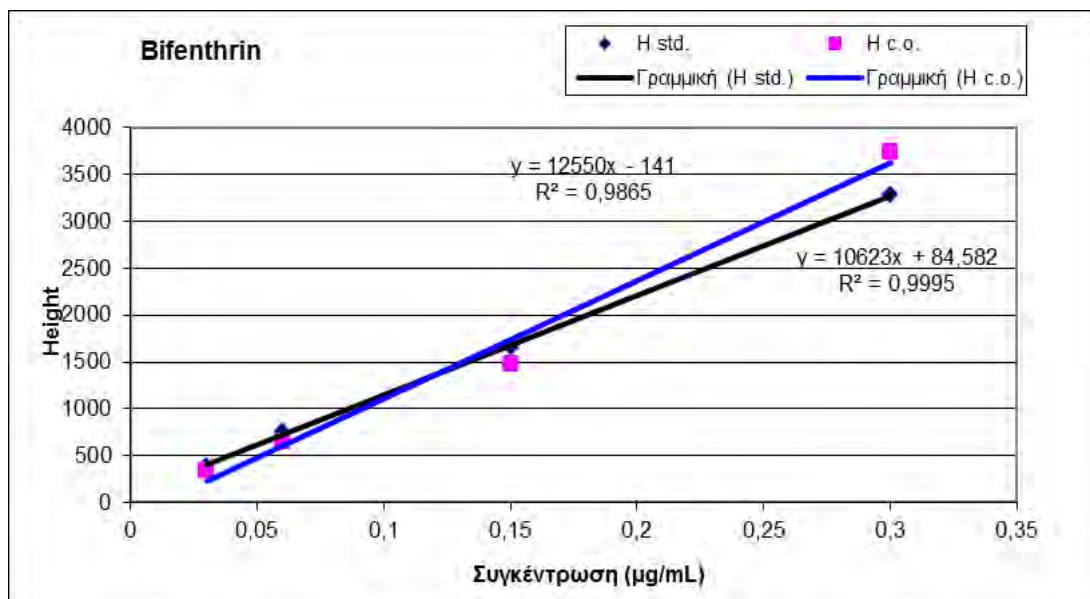
H std: ύψος κορυφής προτύπου σε διαλύτη τολουόλιο



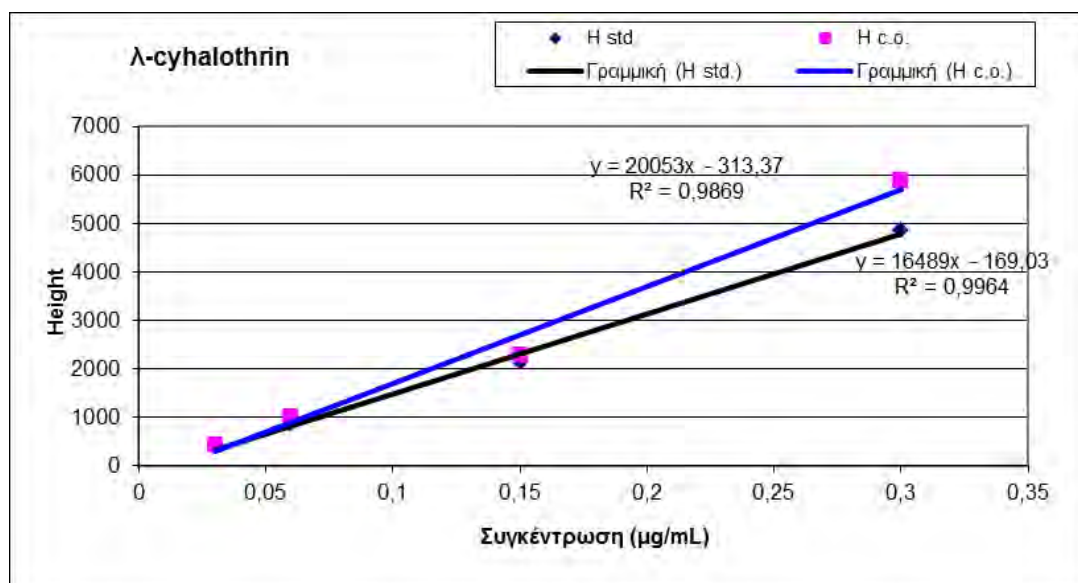
Διάγραμμα 2. Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία β-Endosulfan σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου



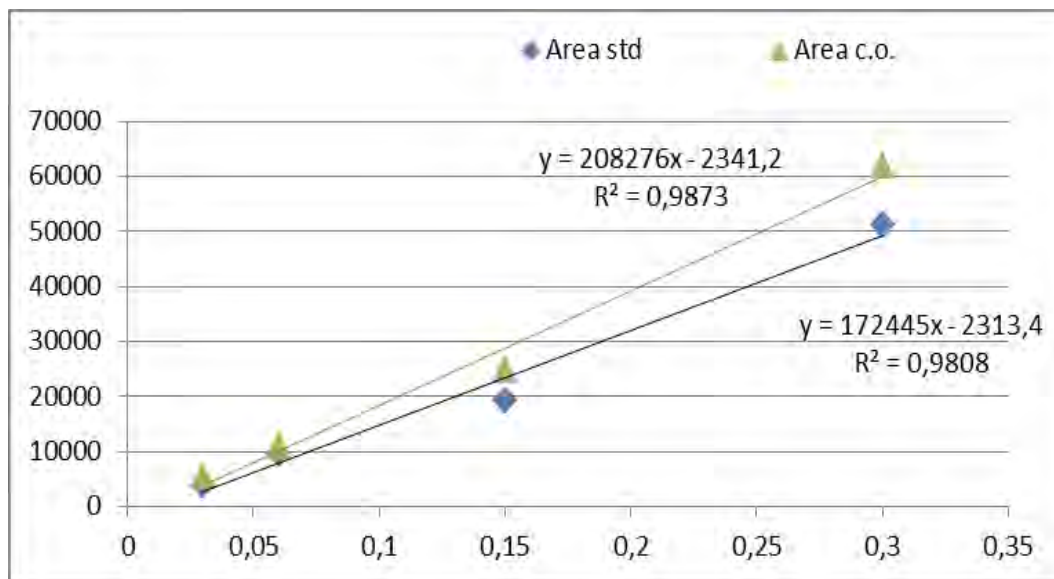
Διάγραμμα 3. Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Endosulfan sulfate σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου



Διάγραμμα 4. Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Bifenthrin σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου



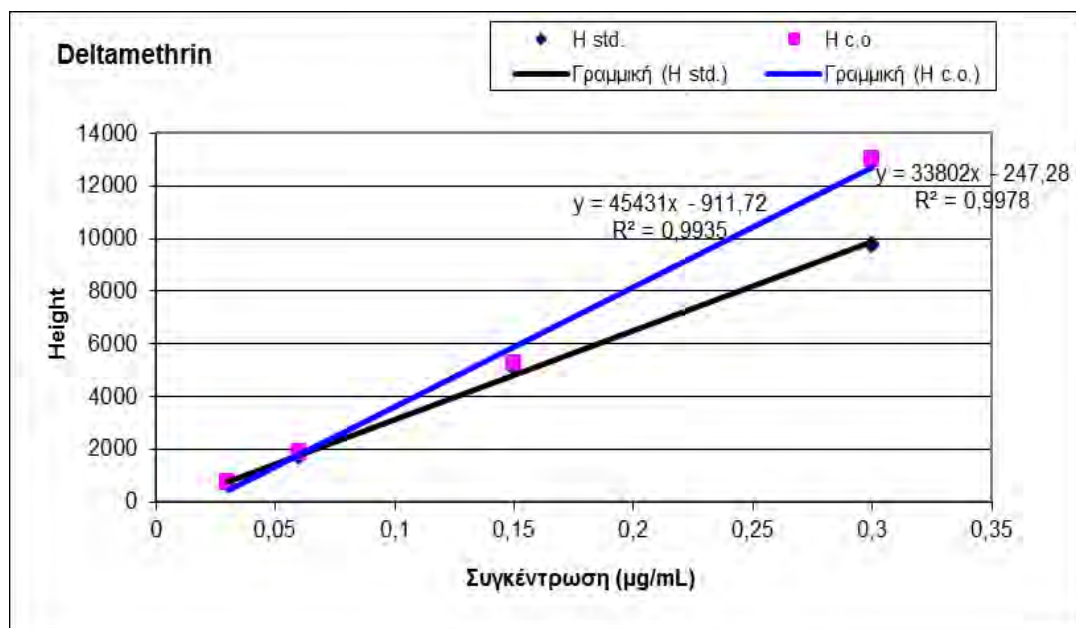
Διάγραμμα 5. Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Lambda cyhalothrin σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου



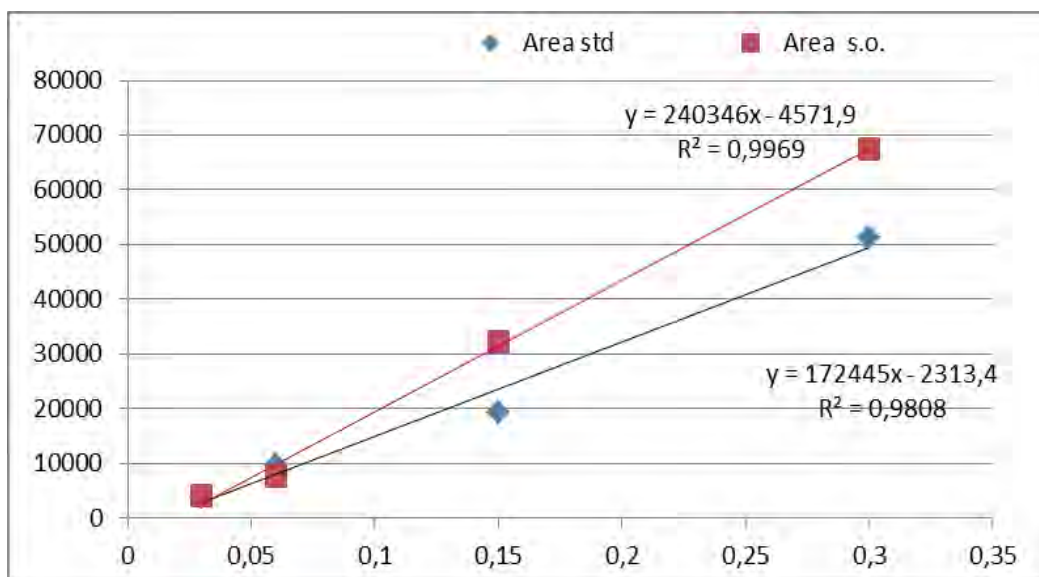
Διάγραμμα 6. Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Cypermethrin σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου

Area std: εμβαδόν κορυφής προτύπου διαλύματος σε διαλύτη τολουόλιο

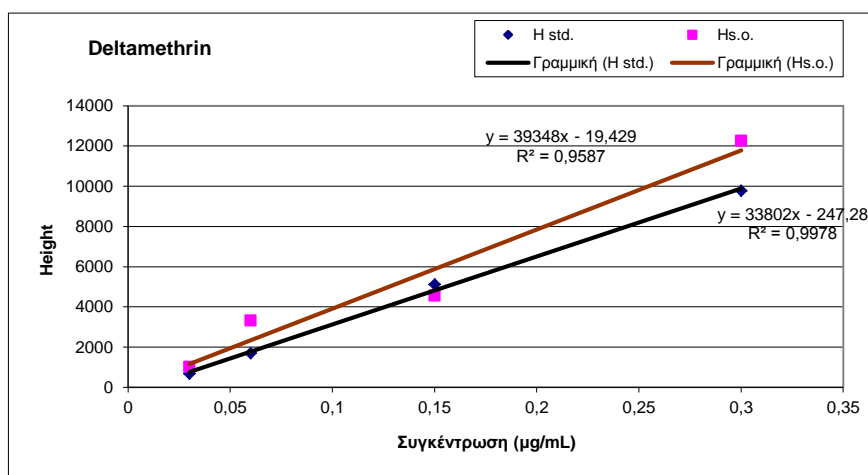
Area c.o: εμβαδόν κορυφής προτύπου διαλύματος σε υπόστρωμα καλαμποκέλαιου



Διάγραμμα 7. Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Deltamethrin σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου



Διάγραμμα 8. Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Cypermethrin σε εκχύλισμα υποστρώματος ηλιελαίου



Διάγραμμα 9. Καμπύλη βαθμονόμησης για τη δραστική ουσία Deltamethrin σε εκχύλισμα υποστρώματος ηλιελαίου.

2.3. Αναλυτικά Χαρακτηριστικά της μεθόδου- Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Για να εκτιμηθεί η ορθότητα και η ακρίβεια της αναλυτικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των φ.ο. - στόχων της μελέτης στα εδώδιμα έλαια πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ανάκτησης για κάθε υπόστρωμα ξεχωριστά. Επίσης, από τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης καθώς και από τα χαρακτηριστικά του χρωματογραφήματος κάθε ανάλυσης υπολογίστηκαν το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) για κάθε ουσία και υπόστρωμα.

2.3.1. Πειράματα ανάκτησης με τη μέθοδο QuEChERS σε καλαμποκέλαιο, ηλιέλαιο και ελαιόλαδο.

Στους **πίνακες 11 και 12** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης με τη μέθοδο της QuEChERS σε τρία επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα καλαμποκέλαιου, ηλιελαίου και ελαιολάδου. Σε κάθε επίπεδο πραγματοποιήθηκαν πέντε επαναλήψεις εμβολιασμού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα πειράματα ανακτήσεων παρατηρήθηκε ότι οι ανακτήσεις για όλες τις Φ.Ο. της μελέτης που προσδιορίστηκαν στον GC-ECD στα εδώδιμα έλαια είναι από σχετικά χαμηλές έως ικανοποιητικές και κυμαίνονται από 45 ± 8 έως 82 ± 3 στο καλαμποκέλαιο, από 45 ± 5 έως 85 ± 5 στο ηλιέλαιο (**πίνακας 11**) και από 45 ± 5 έως 68 ± 8 και για το ελαιόλαδο (**πίνακας 12**).

Όσον αφορά τη κατηγορία των οργανοχλωριωμένων τα Endosulfan α- και β- εμφανίζουν σχετικά χαμηλές τιμές στην ανάκτηση που κυμαίνονται από 51 ± 7 και 60 ± 3 αντίστοιχα σε υπόστρωμα καλαμποκέλαιου, 45 ± 5 και 62 ± 5 σε υπόστρωμα ηλιελαίου ενώ σε υπόστρωμα ελαιολάδου οι τιμές των ανακτήσεων για τα ισομερή Endosulfan κυμαίνονται από 47 ± 7 έως 53 ± 8 αντίστοιχα. Όμως ο μεταβολίτης Endosulfan sulfate εμφανίζει ικανοποιητικές τιμές ανάκτησης (από 68 ± 8 στο ελαιόλαδο, 78 ± 6 στο

καλαμποκέλαιο και 86 ± 5 στο ηλιέλαιο). Όσον αφορά τα Πυρεθροειδή τις χαμηλότερες τιμές ανάκτησης εμφανίζουν τα Bifenthrin (45 ± 8 στο καλαμποκέλαιο, 46 ± 4 στο ηλιέλαιο και 43 ± 16 στο ελαιόλαδο) και Deltamethrin (58 ± 9 στο καλαμποκέλαιο, 55 ± 11 στο ηλιέλαιο και 47 ± 17 στο ελαιόλαδο) ενώ οι ουσίες Lampda cyhalothrin και Cypermethrin εμφανίζουν ικανοποιητικές τιμές ανακτήσεων και στα τρία υποστρώματα εδωδιμων ελαίων. Συγκεκριμένα, στο Lampda cyhalothrin οι τιμές κυμαίνονται από 82 ± 3 στο καλαμποκέλαιο, 87 ± 5 στο ηλιέλαιο και 58 ± 13 στο ελαιόλαδο ενώ στο Cypermethrin εμφανίζονται ανακτήσεις 76 ± 11 στο καλαμποκέλαιο, 78 ± 11 στο ηλιέλαιο και 47 ± 17 ελαιόλαδο.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου όπως αναφέραμε και παραπάνω είναι πολύ καλή καθώς το RSD είναι μικρότερο από 23%. Στο ελαιόλαδο οι τιμές κυμαίνονται από (8 έως 22%), στο καλαμποκέλαιο έχουμε ακόμα καλύτερο RSD, καθώς οι τιμές κυμαίνονται από 3 έως 11% και τέλος στο ηλιέλαιο οι τιμές είναι από 4 έως 11%. Γενικά, θα λέγαμε ότι καλύτερες τιμές επαναληψιμότητας παρουσιάζουν τα α- β- και Endosulfan sulfate με τιμές από 3 έως 8% και στα τρία υποστρώματα σε σχέση με τις Πυρεθρίνες που οι τιμές κυμαίνονται από 5 έως 22%. Όσον αφορά το Cypermethrin στο ελαιόλαδο παρουσιάζει 23% επαναληψιμότητα αφού είναι το άθροισμα των επιφανειών των τριών κορυφών που αντιστοιχούν στα στερεοϊσομερή του Cypermethrin I, Cypermethrin II, Cypermethrin III.

Εκτός από την επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι σημαντικό να δούμε και την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου. Για το λόγο αυτό επεκταθήκαμε σε εμβολιασμούς σε υπόστρωμα καλαμποκέλαιου σε συγκέντρωση $0,5 \text{ mg/kg}$ σε τρεις διαφορετικές ημέρες. Τα αποτελέσματα που παραλάβαμε ήταν ικανοποιητικά με μικρές τυπικές αποκλίσεις από 0,8 έως 2,5 και τις υψηλότερες ανακτήσεις εμφάνισαν τα Lampda cyhalothrin με 77 ± 4 και Cypermethrin 70 ± 1 ενώ χαμηλότερες ανακτήσεις εμφάνισαν οι δραστικές ουσίες α- και β- Endosulfan με τιμές 44 ± 8 και 58 ± 3 ενώ ο μεταβολίτης τους Endosulfan sulfate εμφάνισε καλύτερη ανάκτηση 77 ± 3 . Οι τιμές της επαναληψιμότητας κυμάνθηκαν από 3 έως 8%.

Πίνακας11 . Αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης σε διαφορετικά επίπεδα εμβολιασμού καλαμποκέλαιου και ηλιελαίου με την εφαρμογή της αναλυτικής διαδικασίας σύμφωνα με τη μέθοδο εκχύλισης της QuEChERS και ανάλυσης σε σύστημα GC-ECD. Παρουσιάζονται η % ανάκτηση κάθε δραστικής ουσίας και η τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD) για πέντε επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο καθώς ο μέσος όρος των τιμών των ανακτήσεων για όλα τα επίπεδα.

Δραστικές Ουσίες	Επίπεδα εμβολιασμού Καλαμποκέλαιου			Μέσος όρος ανακτήσεων ± RSD	Επίπεδα εμβολιασμού Ηλιελαίου			Μέσος όρος ανακτήσεων ± RSD
	Ανάκτηση ± RSD				Ανάκτηση ± RSD			
	0,05μg/g	0,10 μg/g	0,50 μg/g		0,05μg/g	0,10 μg/g	0,50 μg/g	
<i>α- Endosulfan</i>	45±5	55±4	54±13	51±7	43±6	44±5	49±3	45±5
<i>β-Endosulfan</i>	57±2	65±5	59±3	60±3	61±5	62±6	62±3	62±5
<i>Endosulfan sulfate</i>	72±7	83±7	78±3	78±6	83±5	91±5	85±4	86±5
<i>Bifenthrin</i>	42±15	48±5	44±3	45±8	42±4	45±6	50±2	46±4
<i>Lampda cyhalothrin</i>	78±3	91±4	78±2	82±3	85±6	89±5	86±3	87±5
<i>Cypermethrin</i>	82±10	75±5	72±18	76±11	82±10	73±19	78±5	78±11
<i>Deltamethrin</i>	46±18	66±6	62±3	58±9	47±12	55±8	64±12	55±11

Πίνακας 12. Αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης σε διαφορετικά επίπεδα εμβολιασμού ελαιολάδου με την εφαρμογή της αναλυτικής διαδικασίας σύμφωνα με τη μέθοδο εκχύλισης της QuEChERS και ανάλυσης σε σύστημα GC-ECD. Παρουσιάζονται η % ανάκτηση κάθε δραστικής ουσίας η τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD) για πέντε επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο καθώς ο μέσος όρος των τιμών των ανακτήσεων για όλα τα επίπεδα.

Δραστικές Ουσίες	Επίπεδο Εμβολιασμού Ελαιολάδου			Μέσος όρος
	Ανάκτηση \pm RSD			Ανακτήσεων \pm RSD
	0,05 $\mu\text{g/g}$	0,10 $\mu\text{g/g}$	0,50 $\mu\text{g/g}$	
<i>α-Endosulfan</i>	54 \pm 10	42 \pm 10	45 \pm 2	47\pm7
<i>β- Endosulfan</i>	51 \pm 10	51 \pm 10	56 \pm 5	53\pm8
<i>Endosulfan sulfate</i>	67 \pm 10	71 \pm 12	65 \pm 3	68\pm8
<i>Bifenthrin</i>	43 \pm 20	44 \pm 19	41 \pm 10	43\pm16
<i>Lampda cyhalothrin</i>	59 \pm 19	60 \pm 12	56 \pm 7	58\pm13
<i>Cypermethrin</i>	53 \pm 19	72 \pm 23	52 \pm 23	59\pm22
<i>Deltamethrin</i>	46 \pm 20	48 \pm 15	48 \pm 15	47\pm17

2.3.2. Πειράματα ανάκτησης με την ίδια μέθοδο εκχύλισης για το προσδιορισμό σε ελιά

Για τον έλεγχο των αναλυτικών χαρακτηριστικών της ακολουθούμενης μεθόδου για την ανάλυση ελιάς πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο πειράματα ανάκτησης του Cypermethrin μετά από εμβολιασμό ομογενοποιημένου καρπού ελιάς που προέρχονταν από βιολογική παραγωγή. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με στόχο να προκύψουν τρία επίπεδα συγκέντρωσης Cypermethrin στους καρπούς ελιάς. Αυτά τα επίπεδα ήταν (0,05-0,1-0,5mg/kg). Κάθε εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε από πέντε επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τα πειράματα ανακτήσεων παρατηρήθηκε ότι οι ανακτήσεις για όλες τις φυτοπροστατευτικές ουσίες της μελέτης, οι οποίες προσδιορίστηκαν στον GC-ECD ήταν σχετικά ικανοποιητικές και κυμάνθηκαν από 41 ± 2 έως 78 ± 13 με καλές τιμές επαναληψιμότητας.

2.4. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου - Όρια Ποσοτικοποίησης

Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού της αναλυτικής μεθόδου για κάθε δραστική ουσία μπορεί είτε να υπολογιστούν με βάση τα αποτελέσματα της ορθότητας της μεθόδου και αναφέρονται στην παρούσα εργασία ως **LOQ** (Limit Of Quantification) είτε να εκτιμηθούν με βάση τη σχέση σήματος προς θόρυβο στη περιοχή εμφάνισης κάθε κορυφής και αναφέρονται ως **MDL** (Method Quantification Limit).

Με βάση την πρώτη προσέγγιση η οποία είναι και η προτεινόμενη από την Ευρωπαϊκή Ένωση για τον υπολογισμό των ορίων ποσοτικοποίησης ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού θεωρείται η συγκέντρωση στην οποία τα επίπεδα των ανακτήσεων για κάθε δραστική ουσία ήταν ικανοποιητικά.

Τα όρια ανίχνευσης (Limit of Detection) και ποσοτικοποίησης της μεθόδου προσδιορίστηκαν πειραματικά, προσδιορίζοντας το σήμα του θορύβου και το σήμα των αναλυτών σε λευκά και εμβολιασμένα δείγματα εδάφινων ελαίων. Ως σήμα του οργάνου θεωρήθηκε το εμβαδόν των χρωματογραφικών κορυφών και τα όρια ανίχνευσης και

ποσοτικοποίησης της μεθόδου που προσδιορίστηκαν ως οι συγκεντρώσεις του αναλύτη στο δείγμα οι οποίες αντιστοιχούν σε σήμα 3,3 και 10 φορές το σήμα του θορύβου, υπολογιζόμενο με βάση τη σχέση $LOD=3 \times \text{Signal Noise}$ από τα χρωματογραφήματα των χαμηλότερων συγκεντρώσεων των προτύπων σε εκχύλισμα υποστρώματος και αυτά των εκχυλισμάτων των δειγμάτων του μάρτυρα στον αντίστοιχο χρόνο κατακράτησης της κάθε δραστικής ουσίας. Τα όρια ποσοτικοποίησης παρουσιάζονται στο παρακάτω **πίνακα 13**.

Πίνακας 13. Όρια ποσοτικοποίησης LOQ και MQL(μg/g) για τις δραστικές ουσίες της αναλυτικής μεθόδου για την ανάλυση εδώδιμων ελαίων και τα Ανώτατα Επιτρεπτά Όρια (MRLs) για τις δραστικές ουσίες στην ελιά, καλαμπόκι και ηλίανθο.

Δραστικές Ουσίες	Καλαμποκέλαιο		Ηλιέλαιο		Ελαιόλαδο		MRL (καλαμπόκι)- μg/g	MRL (ηλίανθος)- μg/g	MRL (ελιά)-μg/g
	LOQ(μg/g)	MQL	LOQ(μg/g)	MQL	LOQ(μg/g)	MQL			
<i>α-Endosulfan</i>	0,05	0,0006	0,05	0,0004	0,05	<0,001	0,05	0,1	0,05
<i>β-Endosulfan</i>	0,05	0,0007	0,05	0,0002	0,05	0,001	0,05	0,1	0,05
<i>Endosulfan sulfate</i>	0,05	0,0035	0,05	0,04	0,05	0,003	0,05	0,1	0,05
<i>Bifenthrin</i>	0,05	0,0004	0,05	0,0002	0,05	0,01	0,05	0,1	0,05
<i>Lampda Cyhalothrin</i>	0,05	0,0005	0,05	0,006	0,05	0,01	0,05	0,2	1
<i>Cypermethrin</i>	0,05	0,002	0,05	0,002	0,05	0,025	0,05	0,2	0,05
<i>Deltamethrin</i>	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05	0,05	1

2.5. Εφαρμογή της μεθόδου στην ανάλυση δειγμάτων εδωδιμων ελαίων εμπορίου

Η μέθοδος που δοκιμάστηκε και επικυρώθηκε εφαρμόστηκε στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων μη τυποποιημένων προϊόντων εδωδιμων ελαίων (δέκα δείγματα) είτε μη τυποποιημένων προϊόντων ελαιολάδου (δώδεκα δείγματα) που προέρχονταν είτε από παραγωγούς είτε από το εμπόριο.

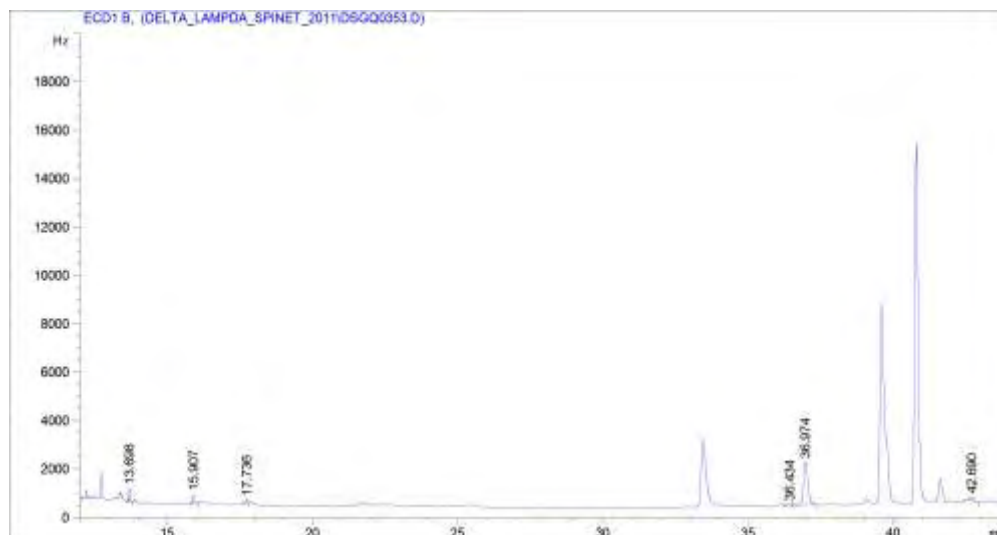
Από τα δέκα δείγματα εδωδιμων ελαίων που αναλύθηκαν στα τέσσερα δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα κάποιας από τις φυτοπροστατευτικές ουσίες στόχους της μελέτης, δηλαδή στα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων τους στο σύστημα GC-ECD δεν εμφανίστηκαν κορυφές στους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης για κάθε δραστική ουσία. Σε τρία δείγματα ανιχνεύθηκαν υπολείμματα Cypermethrin, δηλαδή βρέθηκαν σε επίπεδα μικρότερα από το όριο προσδιορισμού της μεθόδου – MQL. Συγκεκριμένα, στα ηλιέλαια με κωδικούς δειγμάτων 26, C, 27 ανιχνεύτηκαν οι δραστικές ουσίες Bifenthrin, Cypermethrin, ισομερή Endosulfan, Endosulfan sulfate και Deltamethrin. Στο αραβοσιτέλαιο με κωδικό δείγματος B ανιχνεύτηκαν οι δραστικές ουσίες Endosulfan(ισομερή), Endosulfan sulfate και Deltamethrin, ενώ στο εμπορικό μίγμα ελαίων (κραμβέλαιο, ηλιέλαιο και ελαιόλαδο) με κωδικό δείγματος A ανιχνεύτηκε α-,β-Endosulfan και Cypermethrin ενώ προσδιορίστηκε Endosulfan sulfate. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα όρια ποσοτικοποίησης ήταν κατά πολύ πιο χαμηλά από το MRL (**πίνακας 14**).

Στη περίπτωση των ελαιολάδων που αναλύθηκαν στο εργαστήριο σε επτά δείγματα δεν ανιχνεύθηκαν κάποιες από τις ουσίες- στόχους της μελέτης, στα δύο δείγματα ελαιολάδου ανιχνεύθηκε η δραστική ουσία Cypermethrin σε επίπεδα πολύ πιο χαμηλά από το όριο προσδιορισμού της μεθόδου, ενώ στα υπόλοιπα τρία δείγματα ελαιολάδου προσδιορίστηκε η δραστική ουσία Cypermethrin σε επίπεδα από 0,01 έως 0,05 mg/kg.

Τα ευρήματα παρουσιάζονται συνοπτικά στο **πίνακα 14**, ενώ στις **εικόνες 18-21** παρουσιάζονται μερικά χρωματογραφήματα με θετικά ευρήματα από την ανάλυση των ελαίων.

Πίνακας 14. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων διάφορων εδώδιμων ελαίων για προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στόχων της μελέτης.

Κωδικός Δείγματος	Ευρήματα- Δραστική ουσία	Ποσοτικοποίηση Ευρημάτων
26 (ηλιέλαιο)	<i>Deltamethrin</i>	<MQL
A (μίγμα ελαίων- κραμβέλαιο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο)	<i>Cypermethrin</i>	0,0019 μg/g
	<i>Endosulfan sulfate</i>	0,0015 μg/g
	<i>α-, β- Endosulfan</i>	<MQL
B (αραβοσιτέλαιο)	<i>Endosulfan, Deltamethrin,</i>	<MQL
C (ηλιέλαιο)	<i>Endosulfan, Cypermethrin</i>	<MQL
27(Ηλιέλαιο)	<i>Bifenthrin</i>	0,012 μg/g
	<i>Cypermethrin</i>	<MQL
Ελαιόλαδο	<i>Cypermethrin</i>	<MQL
Ελαιόλαδο	<i>Cypermethrin</i>	0,04 μg/g
Ελαιόλαδο	<i>Cypermethrin</i>	0,05 μg/g
Ελαιόλαδο	<i>Cypermethrin</i>	<MQL
Ελαιόλαδο	<i>Cypermethrin</i>	0,0105 μg/g



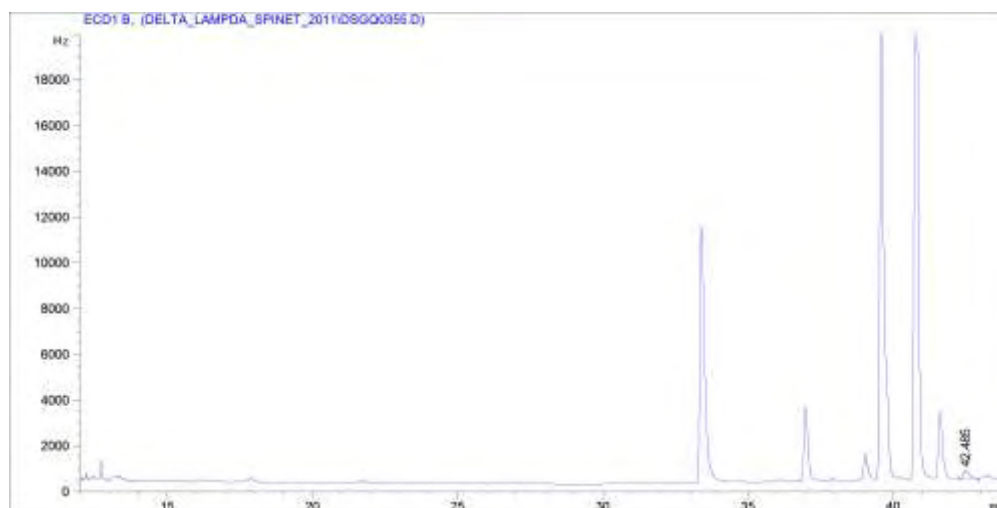
Εικόνα 18. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος εμπορικού μίγματος ελαίων (κραμβέλαιο, αραβοσιτέλαιο και ηλιέλαιο) –Α.

Στο δείγμα αυτό ανιχνεύτηκαν μερικές από τις δραστικές ουσίες στόχους που ερευνούσαμε. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν α- και β- Endosulfan, ο μεταβολίτης Endosulfan sulfate καθώς και Cypermethrin. Οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν ήταν σε κάθε περίπτωση σαφώς χαμηλότερες από τα όρια του MRL.



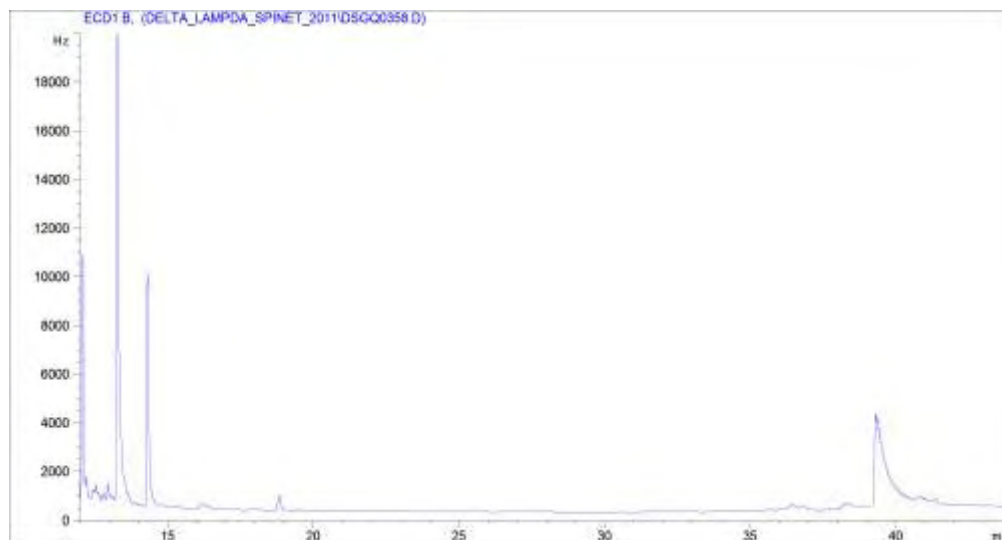
Εικόνα 19. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος αραβοσιτελαίου -Β

Στο δείγμα αυτό ανιχνεύτηκαν μερικές από τις δραστικές ουσίες στόχους που ερευνούσαμε. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν α- και β- Endosulfan, ο μεταβολίτης Endosulfan sulfate καθώς και Deltamethrin. Οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν ήταν σε κάθε περίπτωση σαφώς χαμηλότερες από τα όρια του MRL



Εικόνα 20. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος ηλιελαίου-26

Στο δείγμα αυτό ανιχνεύτηκε μία από τις δραστικές ουσίες στόχους που ερευνούσαμε. Συγκεκριμένα εντοπίστηκε και ποσοτικοποιήθηκε Deltamethrin. Η συγκέντρωση που προσδιορίστηκε ήταν σε κάθε περίπτωση σαφώς χαμηλότερη από τα όρια του MRL.



Εικόνα 21. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος ελαιολάδου στο οποίο δεν ανιχνεύτηκε καμία από τις ουσίες στόχους

Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα ευρήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν ταυτοποιηθεί μόνο με το κριτήριο του χρόνου κατακράτησης σε ένα χρωματογραφικό σύστημα, πράγμα το οποίο δεν παρέχει ασφάλεια στην ταυτοποίηση. Σαφώς η ιδιαίτερη μορφή της χρωματογραφικής απόκρισης για την ανίχνευση του Cypermethrin διευκολύνει την ταυτοποίηση αφού η απόκριση αποτελείται από τρεις κορυφές, που αντιστοιχούν στα ισομερή του. Όταν η ίδια μορφή απόκρισης εμφανίζεται σε ένα άγνωστο δείγμα τότε αποτελεί στοιχείο επιβεβαίωσης για την ταυτοποίηση της παρουσίας του Cypermethrin.

2.6. Προσδιορισμός συντελεστή συμύκνωσης του Cypermethrin του ελαιόκαρπου στο ελαιόλαδο κατά τις διάφορες διεργασίες παραλαβής ελαιολάδου

Η συχνότητα εμφάνισης της συγκεκριμένης δραστικής ουσίας Cypermethrin στον ελαιόκαρπο και στο ελαιόλαδο μας οδήγησε στην ανάγκη για περαιτέρω έρευνα στη πορεία της ουσίας κατά την ελαιοποίηση της ώστε να είναι δυνατό να εκτιμηθεί ο βαθμός συμύκνωσης ή αραίωσης της κατά τη διαδικασία της ελαιοποίησης. Τα ευρήματα της προαναφερθείσας έρευνας είναι χρήσιμα για την εκτίμηση του πιθανού φορτίου του ελαιολάδου σε Cypermethrin, αν είναι γνωστή η συγκέντρωση των προς ελαιοποίηση καρπών.

Η έρευνα αυτή πραγματοποιήθηκε με εργαστηριακή ελαιοποίηση ελαιοκάρπου στον οποίο εφαρμόστηκε το φυτοπροστατευτικό σκεύασμα σε δύο ανεξάρτητα πειράματα με συνολικά πέντε επαναλήψεις. Το επίπεδο της συγκέντρωσης στην οποία μελετήθηκε η πορεία και η τύχη του Cypermethrin καθορίστηκε από τις συγκεντρώσεις, που ανιχνεύθηκαν στο ελαιόλαδο σε συνδυασμό πάντα με το MRL της δραστικής ουσίας στον ελαιόκαρπο. Ο συντελεστής υπολογίστηκε με το λόγο της συγκέντρωσης του Cypermethrin που προσδιορίστηκε στον ελαιόκαρπο ως προς τη συγκέντρωση που προσδιορίστηκε στο παραχθέν ελαιόλαδο μετά από την εργαστηριακή ελαιοποίηση ψεκασμένων ελαιοκάρπων με τη συγκεκριμένη δραστική ουσία.

Πίνακας 15. Προσδιορισμός συντελεστή συμπίκνωσης ή συντελεστή επεξεργασίας της δραστικής ουσίας του Cypermethrin από την ελιά στο ελαιόλαδο.

	Συγκέντρωση Cypermethrin στον ελαιόκαρπο (Ck)	Συγκέντρωση Cypermethrin στο ελαιόλαδο (Coil)	Συντελεστής συμπύκνωσης $F = \text{Coil}/\text{Ck}$
1 ^η Επανάληψη	0,04 µg/g	0,10 µg/g	2,5
2 ^η Επανάληψη	0,04 µg/g	0,11 µg/g	2,75
3 ^η Επανάληψη	0,04 µg/g	0,11 µg/g	2,75
4 ^η Επανάληψη	0,03 µg/g	0,08 µg/g	2,75
5 ^η Επανάληψη	0,03 µg/g	0,08 µg/g	2,75

Από το παραπάνω **πίνακα 15** συμπεραίνουμε ότι η συγκέντρωση του Cypermethrin στο ελαιόλαδο (0,10 µg/g, 0,11µg/g και 0,08 µg/g) είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του Cypermethrin στον ελαιόκαρπο (0,04µg/g και 0,03 µg/g). Αυτό συμβαίνει καθώς είναι αποτέλεσμα της συμπύκνωσης κατά την παραγωγή του ελαιολάδου και η συμπύκνωση αυτή σχετίζεται με τα λιπόφιλα χαρακτηριστικά του cypermethrin (πίνακας 1), που ευνοεί την κατανομή του στο ελαιούχο και όχι στο υδατικό μέρος της ελαιόμαζας. Ο συντελεστής συμπύκνωσης ή συντελεστής επεξεργασίας βρέθηκε ίσος με 2,5 στην 1^η επανάληψη και ίσος με 2,75 στις επόμενες επαναλήψεις. Παρατηρούμε λοιπόν ότι κατά τη διαδικασία της ελαιοποίησης της ελιάς η συγκέντρωση του Cypermethrin στο ελαιόλαδο είναι κατά 2,5-2,75 φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του Cypermethrin στον ελαιόκαρπο.

Από τις βιβλιογραφικές αναφορές δε φαίνεται να υπάρχουν μέχρι στιγμής διαθέσιμα στοιχεία για την κατανομή ή συμπεριφορά της συγκεκριμένης δραστικής ουσίας στη διαδικασία παραλαβής του ελαιολάδου ώστε να γίνει κάποια σύγκριση των αποτελεσμάτων. Ωστόσο υπάρχουν στοιχεία για τις άλλες φυτοπροστατευτικές ουσίες στόχους της εργασίας.. Συγκεκριμένα από τη βιβλιογραφική αναφορά **Αμβράζη Ε., 2007** πληροφορούμαστε ότι οι συντελεστές συμπύκνωσης για το ολικό Endosulfan βρέθηκαν

είναι 2,48, ενώ για το Endosulfan sulfate βρέθηκαν να είναι 1,9. Το Lambda cyhalothrin εμφανίζει συντελεστή συμπύκνωσης ίσο με 2,29, ενώ το Deltamethrin ίσο με 3,93. Επιπλέον, παρόμοιες τιμές για το συντελεστή επεξεργασίας ή συμπύκνωσης προέκυψαν για το Deltamethrin σύμφωνα με τα αναφερόμενα των **Leandri *et al.* 1993**. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του Deltamethrin στο ελαιόλαδο ήταν τρεις φορές μεγαλύτερη όταν τα υπολείμματα στο καρπό ήταν 34-38 $\mu\text{g/kg}$ και έξι φορές μεγαλύτερη όταν τα υπολείμματα στον καρπό ήταν 2-9 $\mu\text{g/kg}$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα διατριβή δοκιμάστηκε, αξιολογήθηκε και εφαρμόστηκε σε λιπαρά υγρά υποστρώματα (εδώδιμα έλαια) η τεχνική εκχύλισης της QuEChERS για το προσδιορισμό επτά φυτοπροστατευτικών ουσιών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες. Πρόκειται για δραστικές ουσίες που ανήκουν στην ομάδα των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων, όπως τα α- και β- Endosulfan και ο μεταβολίτης τους Endosulfan sulfate και στην ομάδα των πυρεθρινών, όπως είναι τα Bifenthrin, Lambda cyhalothrin, Cypermethrin και Deltamethrin.

Η τεχνική αυτή εκχύλισης ήρθε στο φως σχετικά πρόσφατα, μόλις το 2001-2002 από τον Μιχαήλ Άγγελο Αναστασιάδη και αρχικά, η μέθοδος αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό θυρεοστατικών κτηνιατρικών φαρμάκων σε ιστούς των ζώων. Στην πορεία της χρήσης της δοκιμάστηκε με επιτυχία και για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ουσιών σε υποστρώματα φρούτων και λαχανικών και ακολούθως επεκτάθηκε και επεκτείνεται και σε διάφορα άλλα υποστρώματα. Την ονομασία της πήρε από τα αρχικά γράμματα των λέξεων που χαρακτηρίζουν αυτή την τεχνική- QuEChERS (Quick- Easy- Cheap-Effective- Rugged- Safe). Είναι μία μέθοδος εκχύλισης με την οποία μπορούμε με ένα εύκολο, γρήγορο, φθινό, ασφαλή τρόπο να προσδιορίσουμε φυτοπροστατευτικές ουσίες κυρίως στα τρόφιμα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια και στην παρούσα διατριβή επιχειρήθηκε να εφαρμοστεί, να επικυρωθεί και να επεκταθεί- βελτιωθεί προκειμένου να προσδιορίσει υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών σε edώδιμα έλαι πέραν του ελαιολάδου, όπως το αραβοσιτέλαιο και το ηλιέλαιο.

Όσον αφορά το χρωματογραφικό διαχωρισμό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας σε στήλη BPX-5 και με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD) και η ποσοτικοποίηση έγινε με τη χρήση του εξωτερικού μικτού προτύπου των ουσιών σε εκχύλισμα υποστρώματος για κάθε έλαιο). Για την αναγνώριση των κορυφών και την ταυτοποίηση τους χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του χρόνου κατακράτησης και η επιβεβαίωση έγινε με ανάλυση σε διαφορετικής πολικότητας χρωματογραφική στήλη.

Για τον έλεγχο της επίδρασης υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε πρότυπο σε εκχύλισμα υποστρώματος καλαμποκέλαιου, ηλιελαίου και ελαιολάδου καθώς και το

αντίστοιχο πρότυπο σε απλό διαλύτη τολουόλιο. Παρατηρήθηκε έντονα θετική επίδραση υποστρώματος κυρίως στο καλαμποκέλαιο χωρίς αυτό να επηρεάζεται ιδιαίτερα από το επίπεδο της συγκέντρωσης των δραστικών ουσιών ενώ στο ηλιέλαιο παρατηρήθηκε θετική επίδραση μόνο σε συγκεκριμένες ουσίες, όπως τα Endosulfan sulfate, Cypermethrin & Deltamethrin.

Οι ανακτήσεις των φ.ο. κατά την ανάλυση εμβολιασμένων εδάδιμων ελαίων σε πειράματα ανακτήσεων διατηρήθηκαν σε σχετικά ικανοποιητικές τιμές, πάνω από 50%, πράγμα το οποίο ήταν αναμενόμενο λόγω της λιπαρής φύσης των ελαίων που παρεμποδίζουν την εκχύλιση των δραστικών ουσιών από το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από (45-82%) για το καλαμποκέλαιο, (45-87%) για το ηλιέλαιο και (43-68%) για το ελαιόλαδο. Τις υψηλότερες ανακτήσεις εμφάνισαν οι δραστικές ουσίες των Endosulfan sulfate, Lampda cyhalothrin και Cypermethrin για τα δύο πρώτα έλαια ενώ για το τελευταίο μόνο το Endosulfan sulfate. Βέβαια, παρατηρούμε ότι οι τιμές ανάκτησης των δραστικών ουσιών δε διαφέρουν από έλαιο σε έλαιο και αυτό μπορεί εν μέρει να εξηγηθεί από το ότι οι πυκνότητες των ελαίων δεν διαφέρουν και πολύ (για το ελαιόλαδο είναι 0,9 g/mL, για το ηλιέλαιο είναι 0,89 g/mL και η πυκνότητα του καλαμποκέλαιου είναι ίση με 0,88 g/mL).

Παρόλο που η μέθοδος της QuEChERS εμφανίζει σχετικά χαμηλές ανακτήσεις στα έλαια σε σχέση με άλλα υποστρώματα, όπως φρούτα και λαχανικά, μπορεί να θεωρηθεί ακριβής και αποτελεσματική λόγω της καλής της επαναληψιμότητας που εμφανίζει καθώς η σχετική τυπική απόκλιση κυμάνθηκε σε τιμές μικρότερες από 23%. Το πρόβλημα των σχετικά χαμηλών ανακτήσεων μπορεί να διορθωθεί στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων της περιεκτικότητας σε υπολείμματα χρησιμοποιώντας τον ανάλογο για την κάθε ουσία συντελεστή διόρθωσης.

Τα όρια ποσοτικοποίησης της αναλυτικής μεθόδου κυμάνθηκαν σε καλό επίπεδο με το όριο ποσοτικοποίησης - LOQ να είναι στο 0,05 $\mu\text{g/g}$, ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης της μεθόδου-MQL με βάση το θόρυβο του χρωματογραφικού σήματος κυμαίνονται σε ένα εύρος τιμών από <0,001 έως 0,01 $\mu\text{g/g}$ (0,0006 Endosulfan - 0,01 Deltamethrin στο καλαμποκέλαιο, 0,0002 β - Endosulfan- 0,01 Deltamethrin στο ηλιέλαιο και <0,001 Endosulfan -0,01 Deltamethrin) στο ελαιόλαδο. Όλες αυτές οι τιμές των ορίων

ποσοτικοποίησης είναι χαμηλότερες ή κοντα στα επίπεδα των τιμών MRL που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση για τις φ.ο. στόχους για την ελιά, καθώς δεν έχουν θεσπισθεί Ανώτατα επιτρεπτά όρια για τα έλαια..

Στα εμπορικά δείγματα ελαίων που εφαρμόστηκε η μέθοδος ανιχνεύθηκαν (υπολείμματα < MQL) κυρίως οι δραστικές ουσίες Endosulfan, Bifenthrin, Cypermethrin και Deltamethrin. Από τα διάφορα έλαια μόνο σε τρία δείγματα ανιχνεύθηκαν υπολείμματα Cypermethrin, δηλαδή βρέθηκαν σε επίπεδα μικρότερα από το όριο προσδιορισμού της μεθόδου – MQL. Συγκεκριμένα, στα ηλιέλαια ανιχνεύτηκαν οι δραστικές ουσίες Bifenthrin, Cypermethrin, α-Endosulfan και Deltamethrin, στο αραβοσιτέλαιο ανιχνεύτηκαν οι δραστικές ουσίες Endosulfan και Deltamethrin, ενώ στο εμπορικό μίγμα ελαίων ανιχνεύτηκαν Endosulfan και Cypermethrin. Στη περίπτωση των ελαιολάδων που αναλύθηκαν στο εργαστήριο σε επτά δείγματα δεν ανιχνεύθηκε καμμία από τις ουσίες στόχους. Στα υπόλοιπα δείγματα ελαιολάδου ανιχνεύθηκε η δραστική ουσία του Cypermethrin σε όρια κάτω από τη θεσπισμένη τιμή MRL για το λάδι.

Αξίζει να αναφερθεί, ότι στα έλαια ανιχνεύεται συχνά η δραστική ουσία του Endosulfan η οποία αν και δε χρησιμοποιείται ως φ.ο. θεωρείται και εντοπίζεται ως έμμοнос περιβαλλοντικός ρυπος λόγω της μεγάλης του υπολειμματικότητας του στο περιβάλλον. Οι ουσίες αυτές ανιχνεύονται σε διάφορα φυτικά προϊόντα ακόμη και οργανικής (βιολογικής) καλλιέργειας. Στις περιπτώσεις αυτές βέβαια τα επίπεδα συγκέντρωσής τους είναι πολύ χαμηλά και διαφέρουν σαφώς από τα επίπεδα στα οποία θα προσδιορίζονταν αν η παρουσία του Endosulfan οφειλόταν σε παράνομη χρήση των απαγορευμένων σκευασμάτων του.

Το σημαντικότερο συμπέρασμα που προκύπτει από τη παρούσα εργασία έγκειται στη συμπεριφορά της δραστικής ουσίας του Cypermethrin από την ελιά στο ελαιόλαδο μέσω της διεργασίας της ελαιοποίησης. Λόγω απουσίας βιβλιογραφικών δεδομένων για τη συγκεκριμένη ουσία κατά την ελαιοποίηση προχωρήσαμε σε πειράματα με απώτερο στόχο να προσδιοριστεί ο συντελεστής συμύκνωσης του Cypermethrin. Μέσα από τη

πειραματική μελέτη και τη διεξαγωγή των εργαστηριακών μικρο-ελαιοποιήσεων ο συντελεστής επεξεργασίας ή συμπύκνωσης του Cypermethrin υπολογίστηκε 2,5-2,75. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η συγκέντρωση του Cypermethrin στο ελαιόλαδο είναι δύο με τρεις φορές μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της ουσίας αυτής στον ελαιόκαρπο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αμβράζη Γ. Ε. *Ανάπτυξη Μεθοδολογίας και εφαρμογή της στον προσδιορισμό επιλεγμένων φυτοφαρμάκων στην ελιά και στο ελαιόλαδο κατά την διαδικασία παραγωγής του.* Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ιωαννίνων, 2007.

Ανδρικόπουλος Ν.Κ., *Σημειώσεις Χημείας και τεχνολογίας τροφίμων.* Τόμος Ι. Κεφάλαια θεωρίας. Αθήνα 1999

Βεράνη Στ. *Ανάπτυξη, αξιολόγηση και εφαρμογή αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στο ελαιόλαδο.* Μεταπτυχιακή Διατριβή. Βόλος, 2011

Δελγιαννάκης Ι., Χελά Δ., Κωνσταντίνου Ι. *Ενόργανη Περιβαλλοντική Ανάλυση.* Εκδόσεις Τζιόλα, 2010.

Θεριός Ν. Ιωάννης . *Ελαιοκομία.* Εκδόσεις Γαρταγάνη. Θεσσαλονίκη 2005

Ιατρού Ευαγγελία. *Μελέτη φωτοδιάσπασης φυτοφαρμάκων και εκτίμηση της συνδυασμένης τοξικότητας τους στη Lemna minor.* Πτυχιακή διατριβή. 2009

Καρπούζας Γ. *Γεωργική Φαρμακολογία.* Πανεπιστημιακές παραδόσεις, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος. 2003

Κυριτσάκης. Απόστολος. Κ. *Το ελαιόλαδο.* Εκδόσεις Αγροτικές Συνεταιριστικές. 1988

Λιαπής Κ. *Εφαρμογές της Φασματομετρίας Μάζας αρνητικού χημικού ιονισμού στη μελέτη δραστικών ουσιών Γεωργικών φαρμάκων και των υπολειμμάτων αυτών σε γεωργικά προϊόντα.* Διδακτορική διατριβή, Αθήνα 2003.

Λέντζα – Ρίζου Χ., *Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στα αγροτικά προϊόντα.*, 1994.

Μηλιάδης Ε. Γεώργιος, . *Υγρή χρωματογραφία, Θεωρία-Εφαρμογές.* Μπενάκειο
Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Αθήνα 2004

Μπαλατσούρας Γ., Ελαιόλαδο Σπορέλαια. Τόμος Α'. Εκδόσεις Γ.Π.Α. 1995.

Ξανθόπουλος, Φ.Π. *Ο Ηλίανθος.* Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας.
Ινστιτούτο Βάμβακος και Βιομηχανικών φυτών, 1993.

Οδηγία 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 15ης Ιουλίου 1991 σχετικά με τη διάθεση στην
αγορά Φ.Π.

Τζανακάκης Ε. Μίνως. *Εντομολογία.* Εκδόσεις University Studio Press, Θεσσαλονίκη
1995.

Φυτιάνος Κ., Κ. Σαμαρά- Κων/νου. *Χημεία Περιβάλλοντος* University studio press. 2009

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahmed E. <<Analysis of pesticides and their metabolites in food and drinks>>. *TRAC –
Trend. Anal. Chem.* 2001. 20 (11) 649-661

Alder L. Greulich K. Kempe G., Vieth B. <<Residue analysis of 500 high priority
pesticides Better by GC-MS or LC-MS/MS>>. **Mass Spectrometry Reviews**, 25 (6)
2006

Amvrazi E., Albanis T. <<Multiresidue method for determination of 35 pesticides in virgin
olive oil by using liquid-liquid extraction techniques coupled with solid-phase
extraction clean-up and gas chromatography with nitrogen Phosphorus detection

and electron capture detection, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54 (2006), 9642-9651.

Ballesteros E., A. Garcia Sanchez, N. Ramos Martos <<*Simultaneous multi determination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry*>>. **Journal of Chromatography A**, 1111 (2006) 89-96.

Camel V. <<*Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples*>>. **TRAC – Trend. Anal. Chem.**(2000) 19(4) 229-248

Carter. <<*Sunflower Science and Technology*>>. Agronomy Monograph No. **19 Am. Soc. Agron.**, Madison, WI.

Codex Alimentarius Commission-FAO/WHO, CL (2006)/20, 2006

Fernandez Maria Beatriz P.P. Oliveira1. <<*Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives*>>. **Journal of Science** Sep. (2007), 30.

Fuentes Edwar, Marva E. <<*Suitability of microwave-assisted extraction coupled with solid-phase extraction for organophosphorus pesticide determination in olive oil*>>. **Journal of Chromatography A**, 1207 (2008) 38-45

Fooks Richard. *To βιβλίο της ελιάς*. Εκδόσεις Ψύχαλος. Αθήνα 1995

Guardia-Rubio M., R.M. Marchal- Lopez b, M. J. Ayora-Canada a, Ruiz-Medina. <<*Determination of pesticides in olives by gas chromatography using different detection systems*>>. **Journal of Chromatography A**, 1145 (2007) 195-203

Lampropoulou Dimitra A. & Albanis Triantafyllos A. <<*Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by*

chromatography- mass spectrometry-based techniques>> a review. Anal Bioanal Chem (2007) 1663-1683

Leandri, A.; Pompei, V.; Pucci, C.; Spanedda, A.F. <<Residues on olives, oil and processing wastewaters of pesticides used for control of *Dacus oleae*>> (Gmel) (Diptera, Tephritidae). *Anz. Schadlingskde. Pflanzenschutz, Umweltschutz* (1993) 66-48

Lentza-Rizos. <<Monitoring pesticides residues in olive products: organophosphorus insecticides in olives and oil>>. **J. AOAC Int.** Vol.77. no 5. (1994).

Lentza-Rizos, E. J. Avramidesa, <<Low temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil>>. **Journal of Chromatography A**, 912 (2001) 135-142

Lentza-Rizos, E. J. Avramidesa. <<Organophosphorus Insecticide Residues in Virgin Greek Olive Oil>>. **Pesticides. Science.** 32 (1991) 161-171

Lentza-Rizos, E. J. Avramidesa, E. <<Determination of residues of Endosulfan and 5 pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with ECD>>, **Journal of Chromatography. A**, 921 (2001) 297-304.

Pensado L., Casais C, Mejuto C., Cela R. <<Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples>>. **Journal of Chromatography. A.** (2005)

Rodriguez-Mozaz S., López de Alda M. J. and Barceló D. <<Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry>> **Journal of Chromatography A**, 1045 (2004)

Sandras, V.O., A.J. Hall, N. Trapani and Villella, <<*Dynamics of rooting and root length: leaf area relationships as affected by plant population in sunflower crops*>>.. **Field Crops Res.**, 28 (1989)

Sara C. Cunha, Steven J Lehotay, Katerina Mastovska, Jos O. Fernandez, Maria Beatriz P.P. Oliveira. <<*Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives*>>. **J. Science.** 30 Sep (2007).

Tsiropoulos N., Aplada-Sarlis P., Miliadis G. and Liapis K. A Gas Chromatographic <<*Determination of Residues of Eleven Insecticides and Two Metabolites on Olive Tree Leaves*>>. **Journal of AOAC International**, 87 (2004).

Vreuls J., Swen R., Guardian V., Kerkhoff M., Jongenotter G., Brinkman U. <<*Automated on-line gel permeation chromatography-gas chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in olive oil*>>. **Journal of Chromatography A**, 750 (1996)

EURACHEM Guide, 1998. The Fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.

<http://el.wikipedia.org/>

<http://www.oliveoilsource.com/page/history-olive>

www.minagric.gr

www.elais.gr

<http://www.medreha.com>

www.vieltha.com/el/olives.

http://www.kathimerini.gr/4dcgi/ w_articles

<http://eur-lex.europa.eu>